



HAL
open science

Matériaux biomimétiques de la paroi cellulaire végétale et modifications enzymatiques

Maëva Touzard

► **To cite this version:**

Maëva Touzard. Matériaux biomimétiques de la paroi cellulaire végétale et modifications enzymatiques. Polymères. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV038 . tel-03828287

HAL Id: tel-03828287

<https://theses.hal.science/tel-03828287>

Submitted on 25 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Sciences des Polymères

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Maëva TOUZARD

Thèse dirigée par **Laurent HEUX**

préparée au sein du **Laboratoire Centre de Recherche sur les
Macromolécules Végétales**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Matériaux biomimétiques de la paroi cellulaire
végétale et modifications enzymatiques**

**Biomimetic materials of the plant cell wall and
enzymatic modifications**

Thèse soutenue publiquement le **24 mai 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Laurent HEUX

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Directeur de thèse

Madame Marie-Christine RALET

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INRAE Centre Pays de la Loire,
Rapporteuse

Monsieur Alain DURAND

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université de Lorraine, Rapporteur

Monsieur Alexis PEAUCELLE

CHARGÉ DE RECHERCHE HDR, INRAE Centre Île-de-France -
Versailles-Grignon, Examineur

Monsieur Hugues BODIGUEL

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes,
Président

Monsieur Jérôme PELLOUX

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université de Picardie Jules Verne,
Invité



À Anne-Marie Touzard.

Remerciements

Tout d'abord, merci Laurent de m'avoir fait confiance pour ce projet et de m'avoir guidée pendant ces 3 années dans le passionnant domaine de recherche que sont les polysaccharides. J'ai apprécié nos échanges, la liberté de réflexion que tu m'accordais et ta capacité à me motiver grâce à tes bonnes idées.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Alain Durand et Marie-Christine Ralet, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et pour votre bienveillance ; Alexis Peaucelle et Jérôme Pelloux, merci pour vos riches discussions qui m'ont fait évoluer au cours de la thèse ; Hugues Bodiguel, merci d'avoir accepté le rôle de président du jury et pour notre collaboration sur les capsules qui m'a apporté une motivation supplémentaire au cours des derniers mois.

Je remercie chaleureusement les stagiaires qui ont largement contribué à ces résultats : Antoine, Chaeryun et Vincent. Merci pour votre gentillesse et votre rigueur, j'ai eu toute confiance dans la qualité de votre travail.

J'ai eu la chance de collaborer avec de nombreuses personnes, notamment au CERMAV, et je les remercie pour le temps et l'expertise qu'elles m'ont partagés. L'ensemble des membres de l'équipe SPG m'a toujours été de bons conseils et source de bonne humeur et de convivialité. Franck, Pierre et Stéphanie, je vous remercie pour votre aide significative à différentes étapes du projet. Laurine, tu m'as beaucoup aidée pour amener ce projet aussi loin que je le souhaitais. J'ai énormément apprécié travailler avec toi, ton énergie et ta motivation étaient précieuses ! Sébastien et Sylvie, merci d'avoir formé la novice des enzymes que j'étais. Je remercie également le personnel des plateaux techniques de RMN, de microscopie et de chromatographie du CERMAV et de l'ICMG, ainsi que le personnel technique et administratif du CERMAV. Merci également aux membres de mon CSI, à l'EDCSV et à l'UGA.

Je remercie l'ANR pour le financement de ce projet pluridisciplinaire. Cette collaboration avec l'UPJV et l'ENS Lyon m'a permis de rencontrer des chercheurs d'autres horizons : merci Jérôme, Valérie et Wafae, je garde un excellent souvenir de mon séjour à Amiens et de nos échanges. Merci également Arezki et ton équipe. J'ai beaucoup appris grâce à vous.

Je n'aurais pu accomplir ce projet aussi facilement sans le soutien précieux de ceux qui égayaient mes journées. Les voisins du bureau 28, vous gardez une place particulière dans mon cœur ! Merci Yotam d'avoir été un mentor des modèles biomimétiques et du roller. Merci Axel, François, Josselin et Nora pour nos nombreuses discussions plus ou moins sérieuses mais loin d'être inutiles. Merci les collègues des pauses café, cafèt et autres joyeusetés : Antoine, Fabien, Johnathan M., Julien, Léa L., Marie-Alix, Mélina. Sans oublier : Alessia, Arnel, Assira, Claire, Christophe, Clémentine, Jia, Joao, Johnathan L., Lauric, Léa C., Marie, Rubal, Wei, ... J'ai passé d'excellents moments avec vous tous !

Je n'aurais pas pu arriver à ce niveau d'étude sans le soutien indéfectible de ma famille. Maman, Papa, Anaëlle et Manon, je sais que je pourrai toujours compter sur vous et je vous en suis éternellement reconnaissante. Les amis qui m'entourent ont également une part de responsabilité dans mon succès. Je pense en particulier aux grenoblois : Caro, Claire, Eva, Faustine, Sophie et l'ensemble de la team blind test, ces moments passés avec vous étaient parfaits pour décompresser. Merci à mon coach d'escalade et de rédaction, Fabien, tes mots d'encouragements ont été efficaces ! Merci à ceux qui ont assisté à ma soutenance de thèse en présentiel ou en visio et à ceux qui ont contribué à fêter cet accomplissement comme il se doit. Also thank you Christina and Julian for coming this long way even though you couldn't understand a word of my speech, that means a lot to me!

Enfin, Guillaume merci de m'avoir suivie dans cette aventure et de me rendre la vie aussi belle.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : Contexte et objectifs	3
I. La paroi primaire d'une cellule végétale	5
<i>I.1 Composition</i>	5
I.1.a Cellulose.....	6
I.1.b Hémicelluloses et xyloglucane	7
I.1.c Pectines.....	7
I.1.d Phase aqueuse de la paroi	9
<i>I.2 Interactions entre les polysaccharides</i>	10
I.2.a Interactions entre cellulose et xyloglucane.....	10
I.2.b Interactions des pectines avec les autres polysaccharides	11
II. Gels de pectines	12
<i>II.1 Structure et formation des gels de pectines</i>	12
II.1.a Mécanismes de gélification des pectines.....	12
II.1.b Gels pectines – calcium.....	12
<i>II.2 Propriétés des gels</i>	14
II.2.a Gonflement des gels	14
II.2.b Élasticité des gels	17
<i>II.3 Paramètres influençant les propriétés des gels pectines-calcium</i>	20
II.3.a Structure des pectines	20
II.3.b Milieu de gélification	21
III. Architecture, propriétés mécaniques et croissance de la paroi végétale	23
<i>III.1 Modèles d'architecture de la paroi primaire</i>	23
III.1.a Modèles issus de caractérisations biochimiques	23
III.1.b Modèles issus de caractérisations structurales par RMN	25
<i>III.2 Propriétés mécaniques de la paroi</i>	26
III.2.a Module d'élasticité des parois primaires	26
III.2.b Modélisation du comportement mécanique d'une paroi	28
<i>III.3 Enzymes de remodelage des homogalacturonanes</i>	29
III.3.a Enzymes de modifications structurales	29
III.3.b Enzymes de dégradations	31
<i>III.4 Élongation de la paroi végétale</i>	32
III.4.a Direction de croissance.....	32
III.4.b Hypothèses du rôle des modifications structurales du xyloglucane	33

III.4.c	Hypothèses du rôle des modifications structurales des pectines	33
IV.	Objectifs	36
IV.1	<i>Reproduction d'une paroi modèle</i>	36
IV.2	<i>Comportement d'enzymes sur des parois modèles</i>	37
IV.3	<i>Analyses mécaniques de la relation structure-propriétés d'un modèle de paroi</i>	37
Chapitre 2 :	Matériel et méthodes	39
I.	Techniques de caractérisation structurales.....	40
I.1	<i>Résonnance magnétique nucléaire (RMN).....</i>	40
I.1.a	RMN ¹ H liquide.....	40
I.1.b	RMN de l'état solide	40
I.2	<i>Chromatographies.....</i>	40
I.2.a	Détermination des masses molaires par SEC	40
I.2.b	Chromatographie échangeuse d'anion (HPAEC).....	41
I.2.c	Méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse	41
I.2.d	Séparation et quantification des oligomères de pectines	42
II.	Caractérisation des pectines	42
II.1	<i>Préparation des pectines</i>	42
II.2	<i>Degré de méthylestérification.....</i>	43
II.2.a	RMN ¹ H.....	44
II.2.b	RMN de l'état solide	45
II.3	<i>Distribution des motifs d'estérification</i>	47
II.4	<i>Composition osidique</i>	47
II.4.a	Chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC)	48
II.4.b	Chromatographie en phase gazeuse.....	49
II.4.c	RMN de l'état solide	50
II.5	<i>Masses molaires</i>	51
III.	Fabrication des matériaux	51
III.1	<i>Caractéristiques et préparation des composants initiaux</i>	51
III.1.a	Microfibrilles de cellulose.....	51
III.1.b	Pectines.....	51
III.1.c	XG	52
III.1.d	Solution de calcium	52
III.2	<i>Protocole</i>	52
IV.	Réactions enzymatiques	53
IV.1	<i>Réactifs</i>	53
IV.1.a	Enzymes	53
IV.1.b	Autres réactifs.....	54

IV.2	<i>Réactions en solution homogène</i>	54
IV.3	<i>Réactions sur matériaux</i>	54
IV.3.a	Échantillonnage	54
IV.3.b	Conditions expérimentales	55
IV.3.c	Méthodes d'analyses	55
V.	Caractérisation des matériaux	56
V.1	<i>RMN de l'état solide</i>	56
V.2	<i>Gonflement</i>	56
V.3	<i>Essai de traction uniaxiale</i>	57
V.4	<i>Essai cyclique et relaxation de contrainte</i>	58
V.5	<i>Fluage</i>	58
Chapitre 3 : Modèles de paroi cellulaire végétale et comportement physico-chimique .. 59		
I.	Comportement de matériaux cellulose/pectines hydratés	61
I.1	<i>Préambule : gonflement d'un gel polyélectrolyte</i>	61
I.2	<i>Cinétique de gonflement</i>	62
I.3	<i>Effet de la concentration en calcium</i>	63
I.4	<i>Rôle de la force ionique</i>	64
I.4.a	Force ionique constante et variation de la concentration en calcium	64
I.4.b	Variation de la force ionique et concentration en calcium constante	65
I.5	<i>Rôle du pH</i>	66
I.6	<i>Contrôle de la pression osmotique</i>	66
I.6.a	Évolution du taux de gonflement avec la pression osmotique de la solution de réhydratation	66
I.6.b	Réversibilité de la réhydratation dans une solution à pression osmotique contrôlée	67
I.6.c	Effet de la concentration en calcium dans une solution de réhydratation à pression osmotique contrôlée	68
I.6.d	Effet de la force ionique dans une solution de réhydratation à pression osmotique contrôlée	68
I.7	<i>Synthèse de la partie I</i>	69
II.	Conséquences des paramètres physico-chimiques sur les propriétés mécaniques des matériaux MFC/pectines	71
II.1	<i>Relation entre le gonflement et les propriétés mécaniques des matériaux MFC/P52</i>	71
II.1.a	Contrôle de la pression osmotique	73
II.1.b	Concentration en calcium	74
II.1.c	Rôle du pH	74
II.2	<i>Influence du taux de réticulation du réseau pectique sur les propriétés des matériaux MFC/pectines</i>	75
II.2.a	Impact sur le gonflement	75
II.2.b	Impact sur les propriétés mécaniques	76

II.3	<i>Synthèse de la partie II</i>	78
III.	Comportement des matériaux biomimétiques en fonction de leur composition en cellulose, pectines et xyloglucane	79
III.1	<i>Comportement de gonflement selon la composition</i>	79
I.1.a	Influence des proportions de pectines et de XG sur le gonflement des matériaux.....	79
III.1.a	Influence de la proportion en cellulose sur le gonflement des matériaux.....	81
III.2	<i>Comportement en traction selon la composition</i>	81
III.2.a	Influence des proportions en XG et pectines sur les propriétés mécaniques.....	82
III.2.b	Influence de la fraction volumique de MFC sur les propriétés mécaniques.....	83
III.3	<i>Synthèse de la partie III</i>	87
IV.	Conclusion du chapitre	89
Chapitre 4 :	Activité enzymatique sur matériaux biomimétiques	91
I.	Réactivité d'une PME sur film biomimétique	92
I.1	<i>Cinétique et modifications structurales</i>	93
I.1.a	En solution.....	93
I.1.b	Modification enzymatique des matériaux MFC/P52.....	96
I.1.c	Comparaison des motifs de déméthylation.....	99
I.2	<i>Conséquences sur les propriétés mécaniques des matériaux</i>	103
I.2.a	Effets de la concentration et du temps.....	103
I.2.b	Gonflement.....	105
I.2.c	Module d'élasticité.....	106
I.2.d	Propriétés à la rupture.....	107
I.3	<i>Synthèse partie I</i>	108
II.	Rôle des paramètres physico-chimiques sur la réactivité d'une PME	109
II.1	<i>Milieu réactionnel</i>	109
II.1.a	Effet du pH.....	109
II.1.b	Contrôle du gonflement par la pression osmotique.....	110
II.1.c	Concentration en calcium.....	112
II.2	<i>Composition du matériau</i>	114
II.2.a	Modifications structurales.....	114
II.2.b	Modification des propriétés mécaniques.....	116
II.3	<i>Synthèse partie II</i>	116
III.	Étude d'enzymes de remodelage de différentes origines	118
III.1	<i>PME processives</i>	118
III.1.a	Activité enzymatique.....	118
III.1.b	Distribution des motifs d'estérification (DB).....	120
III.1.c	Propriétés mécaniques.....	122

III.1.d	Synthèse et comparaison avec phénotypes sur végétaux.....	124
III.2	<i>Polygalacturonases de plantes</i>	125
III.2.a	Activités en solution.....	125
III.2.b	Modifications structurales des matériaux MFC/P52 par les PG.....	126
III.2.c	Modification des propriétés mécaniques des matériaux MFC/P52.....	129
III.2.d	Synthèse et comparaison avec phénotypes sur végétaux.....	130
III.3	<i>Combinaison PME et PG</i>	131
III.3.a	Principe.....	131
III.3.b	Résultats.....	131
III.4	<i>Synthèse partie III</i>	133
IV.	Conclusion du chapitre	135
Chapitre 5 : Comportement viscoélasto-plastique d'une paroi modèle et modélisation du comportement mécanique..... 137		
I.	Caractérisations mécaniques des matériaux MFC/P35	138
I.1	<i>Propriétés en traction uniaxiale</i>	138
I.2	<i>Caractérisations de la viscoélasticité</i>	139
I.2.a	Relaxation des contraintes.....	139
I.2.b	Fluage.....	139
I.3	<i>Caractérisation de la viscoplasticité par traction cyclique</i>	142
I.3.a	Analyse du matériau MFC/P35/Ca ²⁺	142
I.3.b	Évaluation des contributions élasto-viscoplastiques par analyse des déformations résiduelles.....	144
I.3.c	Évaluation des contributions élasto-viscoplastiques par analyse de l'énergie dissipée.....	147
I.4	<i>Synthèse</i>	149
II.	Modélisation des propriétés	151
II.1	<i>Modèles rhéologiques classiques</i>	151
II.2	<i>Modèle de Bingham généralisé</i>	152
II.2.a	Principe.....	152
II.2.b	Applications aux essais de relaxation.....	153
II.3	<i>Modèles incluant une distribution des temps de relaxation</i>	154
II.3.a	Modèle de Maxwell généralisé.....	154
II.3.b	Modèle de Zsivanovits.....	155
II.4	<i>Modélisation des essais de traction avec le modèle de Bingham généralisé</i>	156
II.4.a	Application du modèle à des essais de traction.....	156
II.4.b	Application aux essais cycliques.....	157
II.5	<i>Synthèse</i>	158
III.	Conclusion du chapitre	159

Conclusion.....	161
Chapitre 6 : Annexes.....	165
I. Mise au point d'un matériau autosupporté.....	166
I.1. Choix du type de MFC.....	166
I.2. Intégration de calcium dans la composition.....	166
I.1.a Stratégie expérimentale	167
I.1.b Maintien de l'intégrité du film	167
I.3. Influence du ratio de calcium dans la composition initiale sur les propriétés des matériaux MFC/P52.....	168
I.1.c Impact sur le gonflement.....	168
I.1.d Impact sur les propriétés mécaniques.....	169
II. Annexes du chapitre 3.....	171
II.1. Conséquences de la variation de la concentration en calcium dans le milieu de réhydratation.....	171
I.1.e Pertes de matière.....	171
I.1.f Compétition entre la force ionique et le taux de réticulation.....	172
II.2. Relation entre la concentration en PEG et la pression osmotique de la solution.....	173
II.3. Caractérisation du xyloglucane et évaluation de son interaction avec les MFC.....	173
I.1.g Protocole.....	173
I.1.h Résultats	174
II.4. Modèle d'Halpin-Kardos.....	175
III. Annexes du chapitre 4.....	176
III.1. Influence du DM initial des pectines sur la réactivité de AaPME	176
III.2. Analyses du DB par profilage oligomérique des pectines après action d'AaPME sur les matériaux MFC/P52.....	177
III.3. Phénotypes végétaux de dégradation par des PG.....	178
IV. Annexes du chapitre 5.....	179
IV.1. Analyse statistique des résultats.....	179
I.1.i Fluage	179
I.1.j Essais cycliques : analyse des déformations.....	179
I.1.k Essais cycliques : analyse des énergies	179
IV.2. Champs de déformation.....	179
IV.3. Caractérisation de la viscoélasticité par DMA.....	180
I.1.l Principe.....	180
I.1.m Résultats	181
IV.4. Autre méthode de comparaison des essais de tractions cycliques	182
IV.5. Modèle de Bingham : détail des équations.....	183
I.1.n Modélisation des essais de relaxation.....	184

I.1.o	Modélisation des essais de fluage.....	184
I.1.p	Modélisation des essais de traction à vitesse constante.....	184
IV.6.	<i>Modèle de Taiz</i>	185
Bibliographie.....		187

Introduction

De nombreuses études s'intéressent actuellement aux macromolécules végétales pour le développement de nouveaux matériaux durables. Principaux constituants de la paroi cellulaire végétale, les polysaccharides sont des polymères particulièrement intéressants pour développer des matériaux à partir de ressources abondantes de la biomasse et biodégradables. En effet, la paroi cellulaire végétale a des propriétés élastiques et plastiques remarquables qu'il serait avantageux de pouvoir reproduire. De plus, ce type de matériaux répond à des enjeux environnementaux de plus en plus importants. Le sujet de cette thèse s'intègre dans cette optique et vise à développer des matériaux mimant la paroi cellulaire végétale à partir des principaux polysaccharides la constituant : la cellulose, les pectines et les hémicelluloses. Il fait partie du projet ANR « Wallmime », en partenariat avec les équipes de Jérôme Pelloux à l'université Picardie Jules Verne et d'Arezki Boudaoud à l'ENS.

La paroi cellulaire végétale est un matériau complexe constitué de plusieurs polysaccharides et protéines. Elle joue un rôle important dans la croissance végétale et donc dans la production de biomasse. Au cours de la croissance cellulaire, la paroi primaire est modifiée par des enzymes de remodelages. Les pectines, un de ses composants principaux, sont particulièrement ciblées par ces modifications. Ces réactions enzymatiques sont finement régulées et il est parfois difficile d'observer, *in planta*, les conséquences d'une seule de ces réactions en raison de nombreux mécanismes de compensation. Le lien entre ces modifications et la morphogénèse de la paroi végétale est alors difficile à résoudre.

Des matériaux biomimétiques constitueraient donc dans un premier temps un outil pour la recherche sur la structure et la morphogénèse de la paroi végétale. Réaliser ces réactions enzymatiques sur un matériau mimétique, devrait permettre de s'affranchir des mécanismes de compensation de la cellule végétale, ce qui rendrait plus aisée l'interprétation des phénomènes de restructuration de la paroi. De plus, ces matériaux répondant à des stimuli enzymatiques et dont les propriétés peuvent évoluer au cours du temps seraient particulièrement innovants. Ce genre de matériaux constitue un intérêt pour des domaines tels que l'encapsulation de principes actifs car des stratégies de relargage pourraient être réalisées grâce à cette particularité.

Le 1^{er} chapitre de cette thèse vise à établir un état de l'art des connaissances actuelles de la paroi végétale en lien avec sa croissance. Ses constituants principaux sont d'abord décrits. Les pectines étant actuellement sources de nombreuses interrogations concernant la morphogénèse de la paroi, une description plus détaillée de leur structure et de leurs propriétés est réalisée. L'architecture et les propriétés mécaniques résultant de l'interaction des différents polysaccharides sont ensuite expliquées. Celles-ci peuvent être modifiées, notamment par des enzymes de remodelage des pectines. Ces modifications semblent liées à la croissance de la paroi et les principales hypothèses concernant ce phénomène sont détaillées. Enfin, une dernière partie de ce chapitre formule les objectifs du projet.

Le 2^{ème} chapitre rassemble les méthodes utilisées pour cette étude. Une caractérisation détaillée des pectines utilisées est d'abord réalisée car ce sont des éléments majeurs de cette étude. La fabrication des matériaux biomimétiques est expliquée et les méthodes utilisées pour caractériser leurs propriétés et les modifier par voie enzymatique sont présentées.

Dans le 3^{ème} chapitre, les matériaux biomimétiques sont étudiés à l'état humide, par analogie avec une paroi végétale composée en grande partie d'eau. Ce premier chapitre de résultats a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension du comportement des matériaux hydratés en étudiant leur gonflement et leurs propriétés mécaniques. L'évolution de ces propriétés en fonction des caractéristiques

de la phase aqueuse ou de la composition en polysaccharides des matériaux est analysée. Les paramètres d'hydratation les plus adaptés pour la suite du projet sont aussi déterminés grâce à ces résultats.

Des modifications des matériaux biomimétiques par voie enzymatique sont ensuite réalisées dans le chapitre 4. La capacité d'une enzyme de déméthylation des pectines (PME) à agir sur des matériaux est d'abord étudiée. L'influence de paramètres physico-chimique du milieu réactif sur l'activité de la PME est ensuite évaluée. Finalement, des enzymes supplémentaires, et notamment d'origine végétale, sont appliquées sur les matériaux. Ces essais permettent de comparer les conséquences de ces modifications sur les matériaux avec celles qui peuvent être observées sur des végétaux.

Enfin un dernier chapitre cherche à préciser les propriétés mécaniques de ces matériaux. Les comportements viscoélastiques et plastique des matériaux hydratés sont d'abord caractérisés et des comparaisons selon leur composition sont effectuées. Des modélisations de ces essais sont réalisées afin d'essayer de relier ces propriétés viscoélastiques à des paramètres structuraux des matériaux.

Chapitre 1 : Contexte et objectifs

Les végétaux sont constitués de cellules de formes et de fonctions variées. Une cellule végétale se distingue des cellules animales par la présence d'une paroi l'entourant et qui permet de fournir une résistance mécanique élevée aux tissus végétaux. La paroi assure aussi un rôle de protection et de signalétique (McCann et al., 2001; Burton et al., 2010). Une paroi primaire est formée au moment de la division cellulaire au niveau de la membrane plasmique. Elle est séparée de la paroi des cellules adjacentes par la lamelle moyenne (Figure 1.1). La paroi primaire évolue au cours de la croissance végétale. La croissance des cellules végétales correspond à leur allongement jusqu'à un stade de maturation, à partir duquel la paroi va se rigidifier et laisser place à une paroi secondaire, de composition différente (Albersheim et al., 2011).

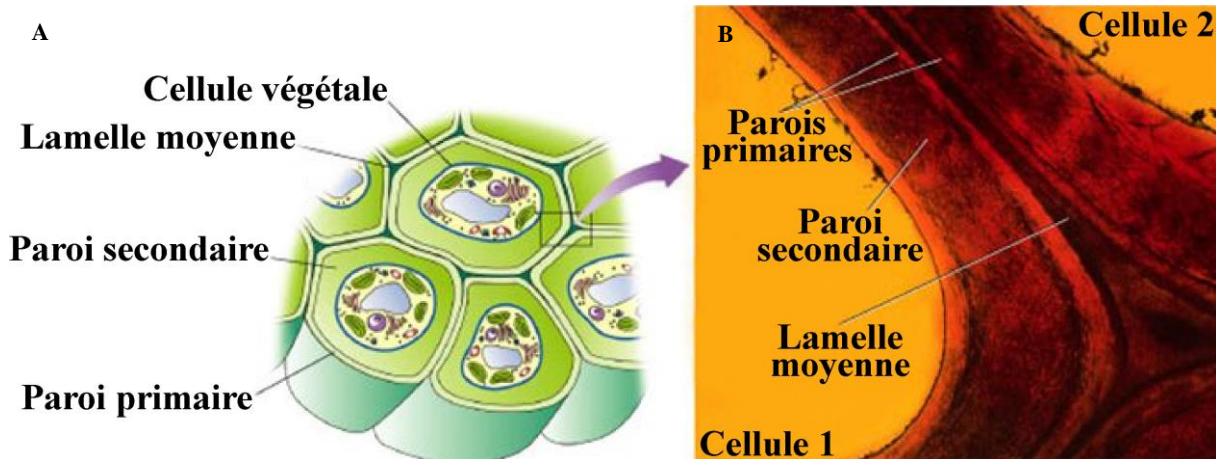


Figure 1.1 : représentation schématique de cellules végétales et de leurs parois (A) et interface entre deux cellules végétales observées au microscope (B) (adapté de GLYCOPEDIA).

La paroi primaire est un matériau composite hydraté principalement constitué de microfibrilles de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de protéines. Bien qu'elle ait été étudiée depuis de nombreuses années, son architecture, les interactions entre ses constituants et leurs rôles, ses propriétés mécaniques et surtout son développement et sa croissance sont des thématiques qui soulèvent toujours des questions.

Au cours de la croissance, la paroi primaire, va subir des changements structuraux et une évolution de sa composition. Ces paramètres vont moduler les propriétés de la paroi, notamment ses propriétés mécaniques, et permettre à la cellule de contrôler sa croissance. Les contributions de plusieurs familles de protéines ont été identifiées comme particulièrement active lors de la croissance végétale. Parmi ces protéines, les enzymes agissant sur les pectines, un des constituants majeurs de la paroi primaire, semblent avoir un rôle capital (Sénéchal et al., 2014).

Les pectines sont des polysaccharides complexes, constitués majoritairement d'un enchaînement d'acides galacturoniques. Ces sucres peuvent être sous forme méthylestérifiée ou non. Les pectines sont particulièrement connues pour former des gels en présence d'ions divalents tel que le calcium. En plus de la paroi primaire, elles sont présentes dans la lamelle moyenne et assurent un rôle de cohésion entre les cellules. Des enzymes présentes dans la paroi végétale peuvent modifier spécifiquement les pectines, en les dépolymérisant ou en modifiant leurs motifs d'estérification.

Les relations entre ces modifications structurales, les propriétés de la paroi végétale et son élongation restent encore mal comprises. Des modèles de croissance végétale existent mais restent difficile à vérifier *in planta* car des effets de compensation entre les enzymes et entre les polysaccharides ont lieu (Bidhendi et Geitmann, 2016). La reconstitution de parois modèles à partir des constituants majeurs de la paroi végétale primaire pourrait permettre de compléter la compréhension des phénomènes observés. Une paroi artificielle biomimétique serait un support contrôlable avec un environnement également contrôlable. L'influence de la composition de la paroi, de la concentration en ions ou du pH du milieu hydratant la paroi sont des exemples de paramètres dont l'impact sur les réactions enzymatiques pourrait être plus facilement évalué avec ces modèles.

De plus, ces parois modèles dont les propriétés peuvent être modifiées grâce à des enzymes sont également des matériaux innovants. Tous les constituants sont biocompatibles et dégradables ce qui en fait un matériau intéressant concernant les enjeux environnementaux et de santé actuels. La modification des propriétés mécaniques par voie enzymatique pourrait permettre la création de matériaux aux formes contrôlées ou de développer des stratégies d'encapsulation.

Ce chapitre s'intéresse dans un premier temps à décrire la paroi végétale, sa composition et les connaissances actuelles sur les interactions entre ses constituants principaux. Une description plus détaillée des pectines et de leur propriété de gélification est réalisée dans la deuxième partie. Une troisième partie présente, dans un premier temps, les modèles d'architecture de la paroi primaire. Cette structure complexe lui confère une résistance importante et les propriétés mécaniques de la paroi sont donc ensuite décrites. Les enzymes de remodelage des pectines et leurs modes d'action sont également présentés dans cette partie. Ces enzymes modifient les propriétés mécaniques de la paroi végétale au cours de la croissance et ont un rôle essentiel dans ce phénomène. Un résumé des hypothèses sur les mécanismes d'élongation de la paroi conclue cette troisième partie. Enfin, une dernière partie résume les problématiques et explique les objectifs de ce projet.

I. La paroi primaire d'une cellule végétale

La paroi primaire de la cellule végétale est un matériau hydraté et composite, de 50 nm à 1 μm d'épaisseur formé à la surface des cellules végétales en croissance (Rose, 2003; Albersheim et al., 2011; Bidhendi et Geitmann, 2019). Malgré la grande diversité des cellules végétales, leur paroi primaire a souvent en commun la présence de trois types de polysaccharides : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Dick-Pérez et al., 2011).

Une description de ces constituants principaux est réalisée dans cette partie. Une étude bibliographique des interactions entre les constituants de la paroi est aussi développée.

I.1 Composition

La paroi végétale fait l'objet d'études depuis de nombreuses années. Principalement constituée de polysaccharides : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Figure 1.2) ; et de protéines, elle est produite au cours de la croissance de la cellule. Ces trois familles de polysaccharides se retrouvent dans les parois primaires de nombreuses espèces mais on s'intéresse ici à décrire celles de cellules de dicotylédones.

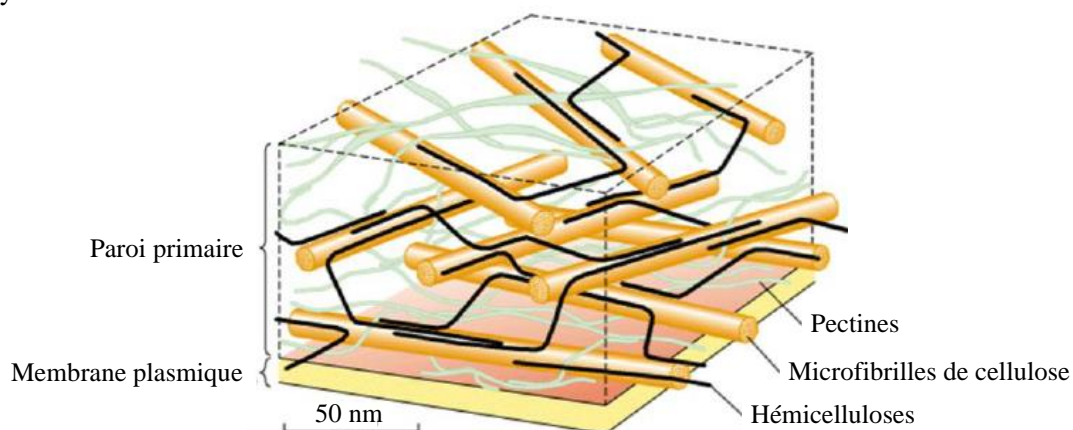


Figure 1.2 : représentation schématique d'une paroi primaire de cellule végétale (d'après Navon, 2020; adapté de McCann et Roberts, 1994).

Ce sont ces polysaccharides qui apportent des propriétés structurales à la paroi et régissent plusieurs de ses propriétés.

I.1.a Cellulose

La cellulose est le constituant le plus abondant des végétaux. On considère en général que la paroi primaire contient 20% à 30% de cellulose. C'est un homopolysaccharide constitué d'un enchainement linéaire de motifs glucoses reliés par des liaisons glycosidiques β -1,4.

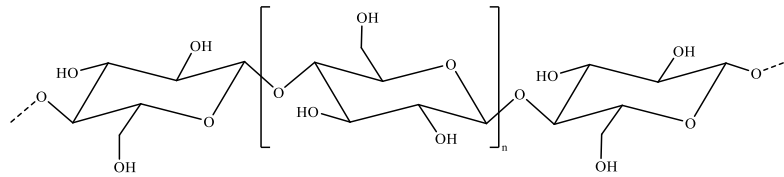


Figure 1.3 : structure de la cellulose.

La cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par des complexes de cellulose synthases (CESA) (Somerville, 2006; Lampugnani et al., 2018). Plusieurs chaînes synthétisées au même moment s'assemblent en microfibrilles, qui elles-mêmes s'assemblent en fibres, grâce à des interactions hydrogène et de Van der Waals (Nishiyama, 2009) (Figure 1.4). Grâce à la structure répétitive du polymère, ces interactions sont particulièrement favorables et des régions cristallines sont formées.

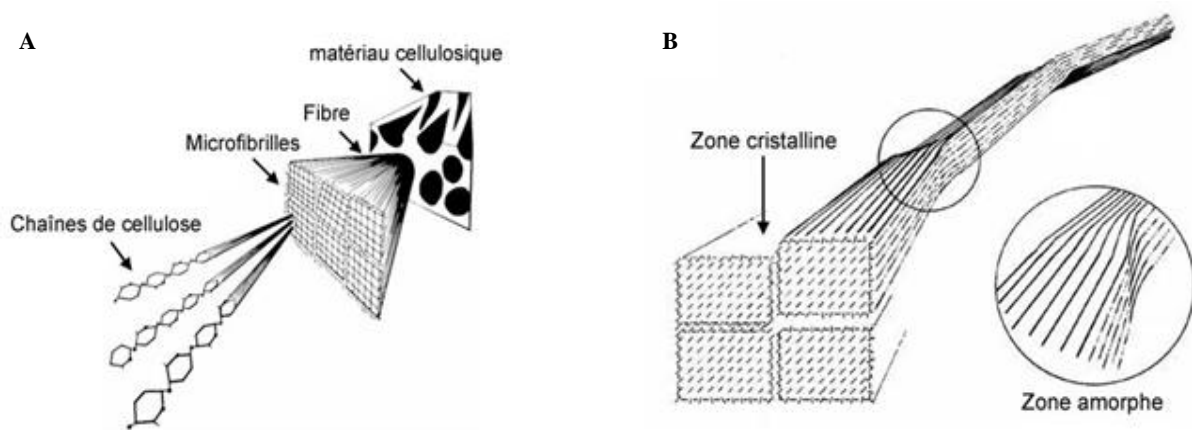


Figure 1.4 : schéma de l'organisation hiérarchique d'une fibre cellulosique (d'après Marchessault et Sundararajan, 1983) (A) et schématisation des zones amorphes dans une microfibrille (d'après Rowland et Roberts, 1972) (B).

Les microfibrilles comportent à la fois des régions cristallines, qui les rendent rigides, et des régions amorphes plus souples. La taille, le taux de cristallinité et la structure cristalline des microfibrilles varient selon l'origine de la cellulose. Cependant au sein de la paroi primaire, la cellulose est peu cristalline (Cosgrove, 2014). La longueur des microfibrilles est estimée être de l'ordre du micromètre et leur diamètre peut aller de 2 à 20 nm (Rongpipi et al., 2019).

L'extraction de la cellulose est bien connue des procédés papetiers et permet d'obtenir des fibres de plusieurs dizaines de micromètres de diamètre et millimètres de longueurs. Des procédés de microfibrillation permettent de réduire la taille des objets et de se rapprocher des dimensions des microfibrilles produites au niveau de la paroi primaire. De cette microfibrillation résulte une suspension gélifiée par les interactions entre les microfibrilles et leurs enchevêtrements (Turbak et al., 1983) (Figure 1.5). Les suspensions de MFC contiennent des fibrilles de dimensions très hétérogènes : leurs diamètres sont de l'ordre de 10 nm à 100 nm et les longueurs micrométriques (Siqueira et al., 2010).

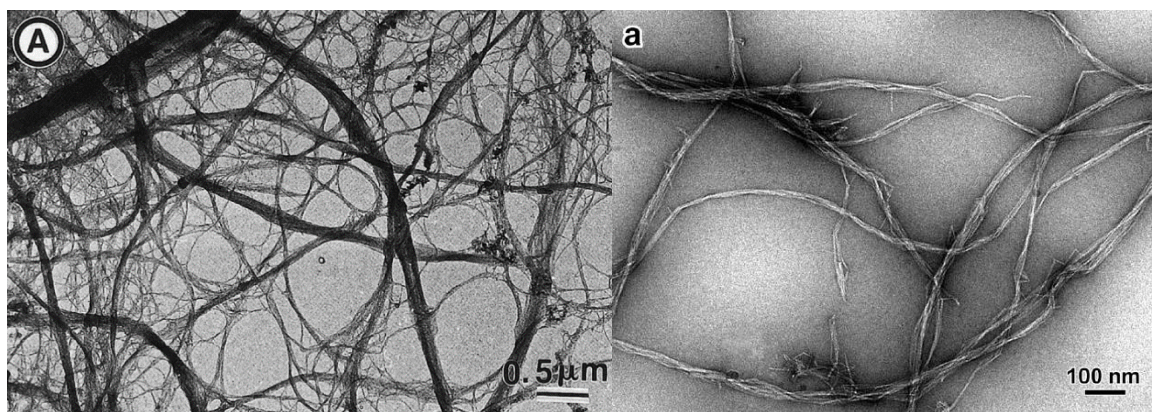


Figure 1.5 : image TEM de suspensions de MFC. MFC de betterave (A) (Dinand et al., 1996) et MFC de bois de feuillus (a) (Guigo et al., 2014).

I.1.b Hémicelluloses et xyloglucane

Les hémicelluloses font partie d'une famille de polysaccharides dont les plus connus sont les xylanes, les xyloglucanes, les mannanes et les glucomannanes. Contrairement à la cellulose, ils sont produits dans l'appareil de Golgi et sont structurellement plus complexes. La plus commune dans la paroi primaire est le xyloglucane et dans les dicotylédones, son ratio peut atteindre 20 à 30% de l'ensemble des polysaccharides de la paroi (Fry, 1989; Scheller et Ulvskov, 2010). Ce polysaccharide a une chaîne principale identique à la chaîne de cellulose, un enchaînement β -1,4 de glucoses, à laquelle sont reliés des branchements d'unités xyloses, galactoses et parfois fucoses (Fry, 1989) (Figure 1.6).

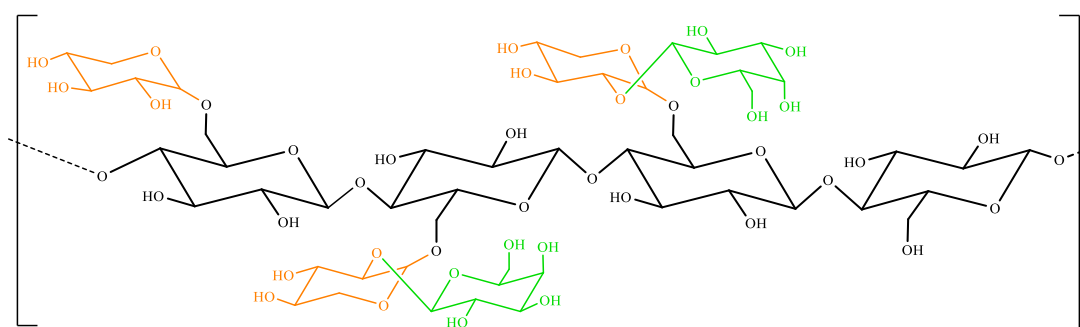


Figure 1.6 : exemple de structure moléculaire du xyloglucane.

La structure des branchements et leur quantité dépendent de la source du xyloglucane. Il est difficile de connaître précisément la masse molaire des chaînes de xyloglucane dans la paroi primaire. Park et Cosgrove (2015) ont recueilli des valeurs allant de 9 kDa à 900 kDa mais beaucoup de résultats la situe entre 100 kDa et 300 kDa (Muller et al., 2011).

En raison de ces branchements présents sur la chaîne principale, le xyloglucane ne forme pas de structure cristalline. Il interagit cependant fortement avec la cellulose, grâce aux proximités structurales existant avec une chaîne de cellulose (Bauer et al., 1973; Pauly et al., 1999). Cette caractéristique est discutée plus loin dans le chapitre.

I.1.c Pectines

Les autres polysaccharides présents dans les parois primaires des cellules végétales sont les pectines. Ce sont des polysaccharides complexes qui peuvent être composés d'une dizaine de monosaccharides différents. Plusieurs groupes polymériques coexistent : l'homogalacturonane (HG), les rhamnogalacturonanes I et II (RG I et RG II) et le xylogalacturonane (XGal) (Figure 1.7).

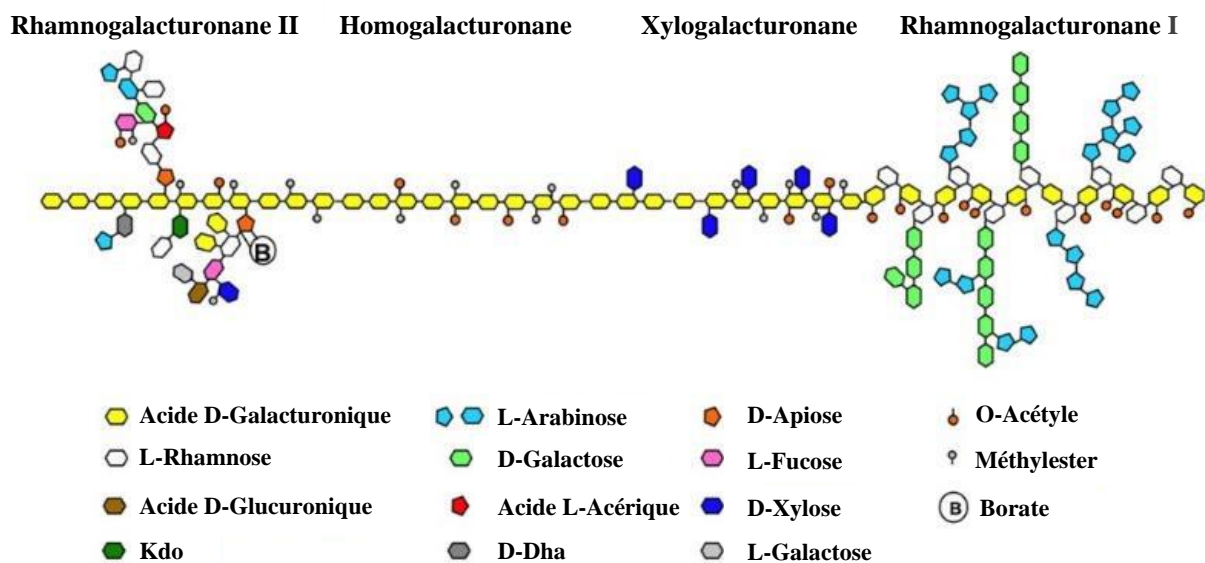


Figure 1.7 : représentation moléculaire schématique des 4 groupes des pectines et des sucres les composant (adapté de Harholt et al., 2010).

1.1.c.i Structure des pectines

Un des constituants principaux des pectines est l'acide α -1,4-D-galacturonique dont l'enchaînement polymérique donne l'homogalacturonane.

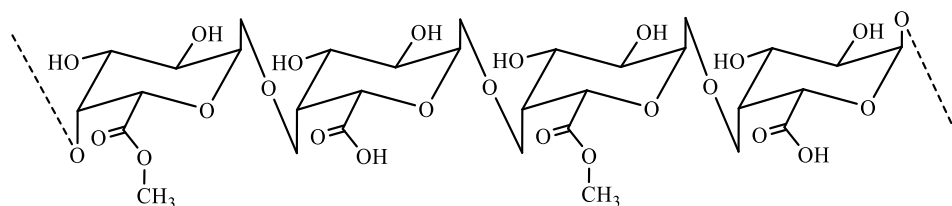


Figure 1.8 : structure d'un enchaînement d'acides galacturoniques méthylés et non méthylés schématisant la structure d'une chaîne d'homogalacturonane.

RG I, le groupement le plus souvent trouvé dans la paroi primaire après HG, est constitué d'une chaîne alternant une unité rhamnose liée à une unité acide galacturonique, ramifiée par des chaînes polymériques de galactoses ou d'arabinoses. XGal est une chaîne HG ramifiée par des xylooses. RG II est un groupement d'une grande complexité. Il est constitué d'une chaîne HG ramifiée par de nombreux sucres. XGal et RG II sont généralement très minoritaires dans la structure des pectines de la paroi primaire des cellules de dicotylédones (Voragen et al., 2009; Harholt et al., 2010).

La façon dont ces groupes sont liés n'est pas totalement établie. Des méthodes d'extraction et de dégradations enzymatiques ont permis d'obtenir des fragments représentatifs. Il a été montré que pour des pectines de diverses sources, l'homogalacturonane se présente sous forme d'un enchaînement d'environ 70 à 100 acides galacturoniques et que seulement 5% de ceux-ci sont reliés à d'autres sucres (De Vries et al., 1981; Thibault et al., 1993). L'hypothèse la plus admise considère donc les pectines comme un copolymère à bloc, constitué de régions dites « lisses » (HG) et de régions branchées (RG) (Voragen et al., 2009). Vincken *et al.* (2003) émettent l'hypothèse qu'au contraire les longues régions d'HG sont des branchements d'un squelette RGI.

1.1.c.ii Substitution des acides galacturoniques

Une caractéristique majeure des pectines est que certains acides galacturoniques peuvent être sous forme méthylestérifiée (Figure 1.8) et/ou être substitués d'un groupement acétyle au niveau de l'hydroxyle en C2 ou C3. Le degré d'acétylation est le pourcentage de sucres acétylés sur l'ensemble des acides

galacturoniques. Il dépend de l'origine des pectines mais est généralement inférieur à 10% (Gou et al., 2012).

Le degré de méthylestérification (DM) représente le pourcentage d'acides galacturoniques méthylés par rapport au total des acides galacturoniques (méthylés et non méthylés). C'est un paramètre clé dans la fonction des pectines car la forme pectate a la capacité de former des liaisons avec des ions, principalement divalents, comme le calcium. Les pectines sont initialement synthétisées dans l'appareil de Golgi avec un DM élevé (O'Neill et al., 1990; Mohnen, 2008) mais des enzymes vont modifier ce DM au cours de la croissance cellulaire. Ces enzymes sont présentées dans la partie III.3 *Enzymes de remodelage des homogalacturonanes*.

1.1.c.iii Motifs d'estérification

Des motifs aléatoires ou groupés, plus ou moins longs, d'acides galacturonique déméthylés résultent de différentes conditions de déméthylestérification. Le caractère bloc ou « degree of blockiness » (DB) des zones déméthylées et plus particulièrement le DB absolu si le DM du système évolue, donnent une indication sur leur distribution (Daas et al., 2000; Guillotin et al., 2005; Ralet et al., 2012).

Le DB est donné par le pourcentage d'acides galacturoniques non méthylés présents dans un enchaînement, un « bloc », par rapport au total des acides galacturoniques non méthylés. Le DB absolu est défini par le pourcentage d'acides galacturoniques non méthylés bloc par rapport au total de tous les acides galacturoniques (méthylés ou non).

Plusieurs méthodes permettent de les estimer. Les plus répandues consistent à dégrader les pectines par une endo-polygalacturonase (endo-PG) et à identifier les oligomères en résultant. Le mécanisme de réactivité des endo-PG nécessite un enchaînement d'au moins 4 acides galacturoniques non-méthylés pour pouvoir couper la liaison glycosidique. Les pectines structurées de façon bloc libèreront donc plus d'oligomères non méthylés.

1.1.c.iv Caractéristiques en milieu aqueux

Une fois extraites, les pectines sont solubles en milieu aqueux pour des concentrations massiques de l'ordre de quelques pourcents. Leur solubilité dépend de leurs caractéristiques structurales.

Leur pKa se situe entre 3,5 et 4,5, il augmente lorsque le DM diminue (Plaschina et al., 1978). À pH inférieur au pKa, les chaînes ont tendance à se regrouper et à former des agrégats de 100 à 200 nm de diamètre, stabilisés grâce à des liaisons hydrogènes. À pH supérieur à pKa, les groupes non méthylés se déprotonnent et les charges créées induisent des répulsions entre les chaînes comme pour un polyélectrolyte (Alba et al., 2018).

Plus de détails sur le comportement des pectines sont donnés dans la partie II *Gels de pectines*.

I.1.d Phase aqueuse de la paroi

La paroi primaire est avant tout un milieu aqueux, pouvant être définie comme un gel. Un gel est un réseau de macromolécules, insolubles, gonflé par un solvant. La masse d'eau dans une paroi est estimée à environ 70% de sa masse totale (Albersheim et al., 2011).

Cette phase aqueuse appelée apoplasme permet, entre autres, d'assurer des échanges moléculaires avec la cellule et le milieu extérieur. Elle contient des protéines, qui peuvent représenter jusqu'à 10% de la composition de la paroi. Des enzymes sont responsables de nombreuses fonctions au sein de la paroi. Certaines peuvent, par exemple, modifier la structure des polysaccharides et on s'intéressera particulièrement à celles agissant sur les pectines plus loin dans le chapitre.

Son pH est considéré être compris entre 4,5 et 7 (Hocq et al., 2017). D'autres éléments sont également présents : des espèces inorganiques ou des petites molécules organiques. Ces dernières peuvent avoir un rôle de signalétique pour la cellule. Parmi les ions inorganiques, on peut citer le calcium comme le plus mentionné dans ce contexte mais tous les ions présents dans l'environnement de la plante peuvent se retrouver dans la paroi primaire et avoir un effet local sur les propriétés de la paroi.

Cette paroi agit donc comme une membrane supplémentaire entre la cellule et son environnement extérieur. Elle est capable de résister à la pression osmotique de la cellule qui peut aller de 0,1 à quelques MPa (Rose, 2003; Somerville et al., 2004; Zsivanovits et al., 2004). Cette compétence semble être assurée par un complexe arrangement des polysaccharides.

I.2 Interactions entre les polysaccharides

La paroi primaire végétale est construite grâce à l'assemblage de ces trois familles de polysaccharides. Elle est déposée à la surface de la membrane plasmique et est séparée de celle des autres cellules par la lamelle moyenne. La lamelle moyenne est constituée de pectines peu méthylestérifiées (Carpita et Gibeau, 1993).

Selon l'espèce et l'origine de la plante, les quantités des différents polysaccharides peuvent varier. Chez les dicotylédones, la composition massique de la paroi sèche est généralement de 20-30% en cellulose, 10-30% en hémicelluloses et 20-35% en pectines. La cellulose est directement synthétisée au niveau de la membrane plasmique de la cellule tandis que les hémicelluloses et les pectines sont synthétisées à l'intérieur de la cellule puis transportées au niveau de la membrane par divers mécanismes biologiques (Burton et al., 2010).

Plusieurs études se sont intéressées aux interactions entre les polysaccharides mais cette thématique reste l'objet de nombreuses interrogations. Un état de l'art sur le sujet est présenté dans cette partie.

I.2.a Interactions entre cellulose et xyloglucane

La cellulose et le xyloglucane sont connus pour interagir entre eux dans la paroi primaire végétale (Bauer et al., 1973; Pauly et al., 1999). Ces interactions particulièrement favorables conduisent au phénomène d'adsorption du xyloglucane sur les surfaces des microfibrilles de cellulose. Dans des études récentes, il est suggéré que le xyloglucane interagit plus particulièrement avec la surface hydrophobe de la cellulose (Zhao et al., 2014).

Des études d'interactions *in vitro* entre surfaces de cellulose et xyloglucane ont montré que les interactions sont dépendantes du ratio de chacun des polysaccharides. Par exemple, Navon (2020) a déterminé un ratio pour lequel des nano-cristaux de celluloses (CNC) sont complètement recouvert de xyloglucane. Il a observé qu'au-delà d'environ 10% de xyloglucane, les CNC sont complètement recouvertes et stabilisées stériquement par le xyloglucane.

Une autre étude a montré, en mesurant des cinétiques d'adsorption et de dégradation par des xyloglucanases, que selon sa concentration, le xyloglucane adopte une conformation d'adsorption différente (Villares et al., 2017). À faible concentration, la conformation du xyloglucane serait étendue à la surface des cristaux de cellulose, tandis qu'à concentration élevée, plus de boucles et de bouts de chaînes mobiles seraient formés (Figure 1.9). Les mêmes observations ont été faites selon la masse molaire du xyloglucane (Dammak et al., 2015) : à faible masse molaire, le xyloglucane s'adsorbe de façon étendue sur le cristal tandis qu'à plus haute masse molaire et ratio, il a tendance à s'adsorber partiellement en laissant des boucles et bouts de chaînes libres. Ces conformations avaient déjà été schématisées par Vincken (1995).

Cette représentation modélise l'adsorption du xyloglucane par la formation de trains à la surface de la microfibrille.

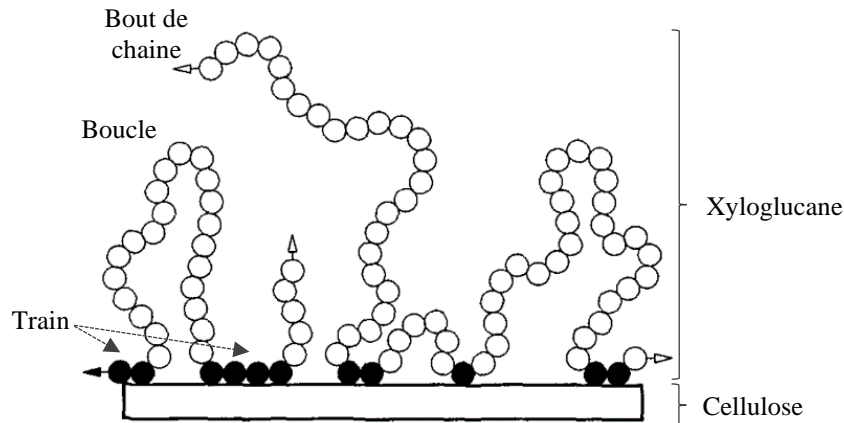


Figure 1.9 : schéma des conformations d'adsorption des molécules de xyloglucane à la surface de la cellulose (d'après Vincken et al., 1995).

Dans les parois primaires la masse molaire du xyloglucane est estimée entre 100 et 300 kDa dans la plupart des cas (Park et Cosgrove, 2015) et le ratio de xyloglucane par rapport à la cellulose est d'environ 1. D'après les considérations discutées précédemment, le modèle de Vincken (1995) semble donc adapté pour schématiser les interactions entre cellulose et xyloglucane dans le contexte d'une paroi.

Ainsi, les interactions entre xyloglucane et cellulose étant très favorables, elles ont depuis longtemps été étudiées. Mais la contribution des pectines dans l'architecture de la paroi et leurs interactions avec les autres polysaccharides posent plus de questions.

I.2.b Interactions des pectines avec les autres polysaccharides

Les pectines sont capables de s'assembler entre elles en présence de cations divalents comme le calcium. Cette spécificité conduit à la formation d'un gel qui est discutée plus en détails dans la partie II *Gels de pectines*.

In vitro, les pectines n'interagissent pas ou très peu avec la cellulose (Zykwinska et al., 2008). Les branchements d'arabinoses et de galactoses des RG1 de pectines semblent plus capables de se lier à la cellulose que les groupements homogalacturonanes (Zykwinska et al., 2005; Jarvis, 2009).

Des analyses RMN multidimensionnelles à l'état solide de parois d'*Arabidopsis* ont cependant révélé que les pectines seraient beaucoup plus en contact avec la surface des microfibrilles que ne le sont les molécules de xyloglucane (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et Hong, 2016). Ces analyses montrent aussi la présence de deux fractions de pectines, l'une très mobile et l'autre plus rigide au contact des autres polysaccharides, comme c'est le cas pour le xyloglucane. Les pectines interagiraient donc avec la cellulose dans la paroi, de façon non covalente. Wang *et al.* (Wang et al., 2015) excluent l'hypothèse d'une proximité liée à la densité de la paroi. Ils observent en effet ces interactions même après une extraction partielle d'homogalacturonanes.

Des liaisons entre xyloglucane et pectines ont été évoquées par Thompson et Fry (2000) mais ces interactions semblent anecdotiques (Abasolo et al., 2009). Ces derniers montrent que les pectines peuvent cependant avoir un impact sur le réarrangement du xyloglucane après sollicitations mécaniques.

Les analyses des interactions entre polysaccharides, à la fois *in vitro* et *in planta*, ont permis d'établir des modèles d'architecture de la paroi. Ils seront présentés dans la partie III.1 *Modèles d'architecture de la paroi primaire*. L'aptitude des pectines à former des gels a aussi un rôle dans l'architecture et les propriétés de la paroi. Il est par exemple suggéré que ce gel est impliqué dans le contrôle de sa porosité (Voragen et al., 2009). Une description détaillée de la formation des gels de pectines et de leurs propriétés est donc donnée dans la partie suivante.

II. Gels de pectines

Les gels de pectines permettraient de contrôler la porosité de la paroi végétale et son hydratation (Ryden et al., 2000). Mais leur rôle structural dans la paroi est encore controversé. Cette étude s'intéresse ainsi à la contribution aux propriétés mécaniques de ce polysaccharide complexe dans des matériaux biomimétiques.

Différents mécanismes peuvent conduire à la gélification des pectines mais on s'intéressera plus particulièrement à celui résultant des interactions des pectines avec le calcium. Les caractérisations du gonflement et de l'élasticité de gels permettent de comparer les propriétés des gels et de les relier à une structure de polymère réticulé. Les propriétés des gels vont être fortement dépendantes de la composition des pectines et des conditions physico-chimiques du milieu de gélification.

II.1 Structure et formation des gels de pectines

Un gel est un réseau 3D de molécules connectées gonflées par un fluide. Les connections peuvent être des liaisons covalentes ou des interactions physiques (Kavanagh et Ross-Murphy, 1998). Dans le cas d'un hydrogel, le réseau de molécules hydrophiles est gonflé par un milieu aqueux. La paroi primaire végétale est un exemple d'hydrogel composite complexe, les polysaccharides formant un ou plusieurs réseaux tridimensionnels gonflés par un milieu aqueux.

II.1.a Mécanismes de gélification des pectines

Plusieurs mécanismes d'association des pectines ont été identifiés. Les pectines, et particulièrement les pectines faiblement méthylées, ont la capacité d'interagir fortement avec plusieurs cations métalliques divalents (Kohn, 1975; Dronnet et al., 1996; Huynh et al., 2016; Kyomugasho et al., 2016). On s'intéressera ici plus particulièrement à la gélification par le calcium.

Les pectines fortement méthylées gélifient *in vitro* dans des conditions acides en présence d'un co-soluté (Oakenfull et Scott, 1984). D'autres mécanismes d'interactions entre pectines dans certaines cellules végétales sont connus : les groupements RG II peuvent interagir via des atomes de bores et les chaînes d'arabinoses dans RG I peuvent s'associer par le biais d'acides féruliques (Sila et al., 2009). Les pectines évoquées dans cette partie sont principalement des pectines issues d'agrumes ou de pommes et majoritairement constituées d'homogalacturonanes. RG I et RG II étant largement minoritaires dans les pectines utilisées dans ce projet, ces interactions ne sont pas discutées ici.

II.1.b Gels pectines – calcium

La gélification des pectines par l'interaction des pectines faiblement méthylées (DM < 50%) avec du calcium est une méthode largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire. Ces gels sont souvent comparés aux gels d'alginate mais les branchements et la distribution parfois aléatoire des acides galacturoniques non-méthylés rendent les structures des gels de pectines difficiles à identifier et les propriétés plus difficiles à contrôler.

Dans les tissus de dicotylédones, les gels de pectines faiblement estérifiées constituent la lamelle moyenne qui assure la jonction entre les cellules en croissance (Carpita et Gibeau, 1993). Ils sont également présents dans la paroi primaire des cellules et pourraient jouer un rôle dans ses propriétés mécaniques et dans les mécanismes de croissance cellulaire (Peaucelle et al., 2012).

II.1.b.i Interactions impliquées

En présence de cations métalliques divalents, comme notamment le calcium, les acides galacturoniques non méthylestérifiés vont créer des jonctions ioniques centrées sur le cation (Figure 1.10). Ces jonctions sont stabilisées par les interactions électrostatiques fortes des complexes carboxyles-ions, mais aussi par des interactions de Van der Waals et hydrogène grâce aux groupements hydroxyles à proximité (Kyomugasho et al., 2016; Maire du Poset et al., 2019).

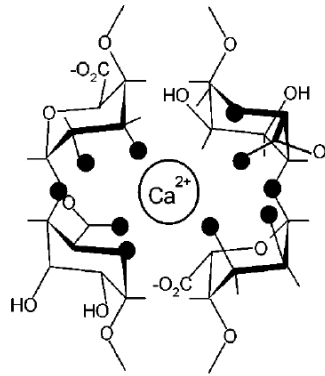


Figure 1.10 : représentation de l'interaction d'un ion calcium avec des acides galacturoniques (Braccini et Pérez, 2001).

II.1.b.ii Description des jonctions

La formation des jonctions nécessiterait un enchainement de 6 à 20 acides galacturoniques (Ralet et al., 2001; Fraeye et al., 2010b). Deux blocs d'enchainements d'acides galacturoniques, parallèles ou antiparallèles, s'associent par dimérisation centrée sur les ions calcium. Elles sont souvent décrites comme des jonctions sous forme de « boîte à œufs » en comparaison avec les alginates mais Braccini et Pérez (2001) ont montré par modélisation que ces jonctions ont une configuration en hélice 2_1 qui est décalée par rapport à celle des alginates. Comme les alginates, la formation des jonctions semble coopérative, les premières interactions favorisant la formation des suivantes (Demarty et al., 1984; Ventura et al., 2013).

Contrairement aux alginates pour lesquelles une agrégation des dimères a lieu (Wolnik, 2014), formant de larges jonctions, les jonctions des pectines semblent constituées de seulement 2 chaînes comme le montrent Fang *et al.* (2008) et Ventura *et al.* (2013). Cependant Schuster *et al.* (2011) observent des agrégats et déterminent le nombre de chaînes impliquées par modélisation. Ces gels sont peu concentrés en pectines ce qui pose la question de l'agrégation des jonctions sur des systèmes plus denses.

II.1.b.iii Paramètres influençant la formation des jonctions

L'obtention d'un gel continu dépend de la taille des enchainements d'acides galacturoniques non méthylés et du degré de polymérisation des homogalacturonanes (Yapo et Koffi, 2013). Les chaînes courtes ne participant pas au réseau neutralisent des sites de jonctions des chaînes longues (Capel et al., 2005; Kyomugasho et al., 2018).

Les interactions physiques peuvent se réarranger et évoluer. Slavov *et al.* (2009) et Agoda-Tandjawa *et al.* (2012a) reportent une augmentation de l'élasticité des gels pendant au moins 20h après la formation des premières interactions (Figure 1.11), ce qui suggère une dynamique de réarrangement des interactions. Les possibilités de réarrangements diminuent avec l'augmentation de la concentration en pectine et une cinétique rapide de gélification est aussi reportée pour des pectines faiblement méthylées (Löfgren et Hermansson, 2004). La formation des jonctions dépend aussi de la température (Figure 1.11). Elles sont moins stables à haute température (Garnier et al., 1993; Cardoso et al., 2003).

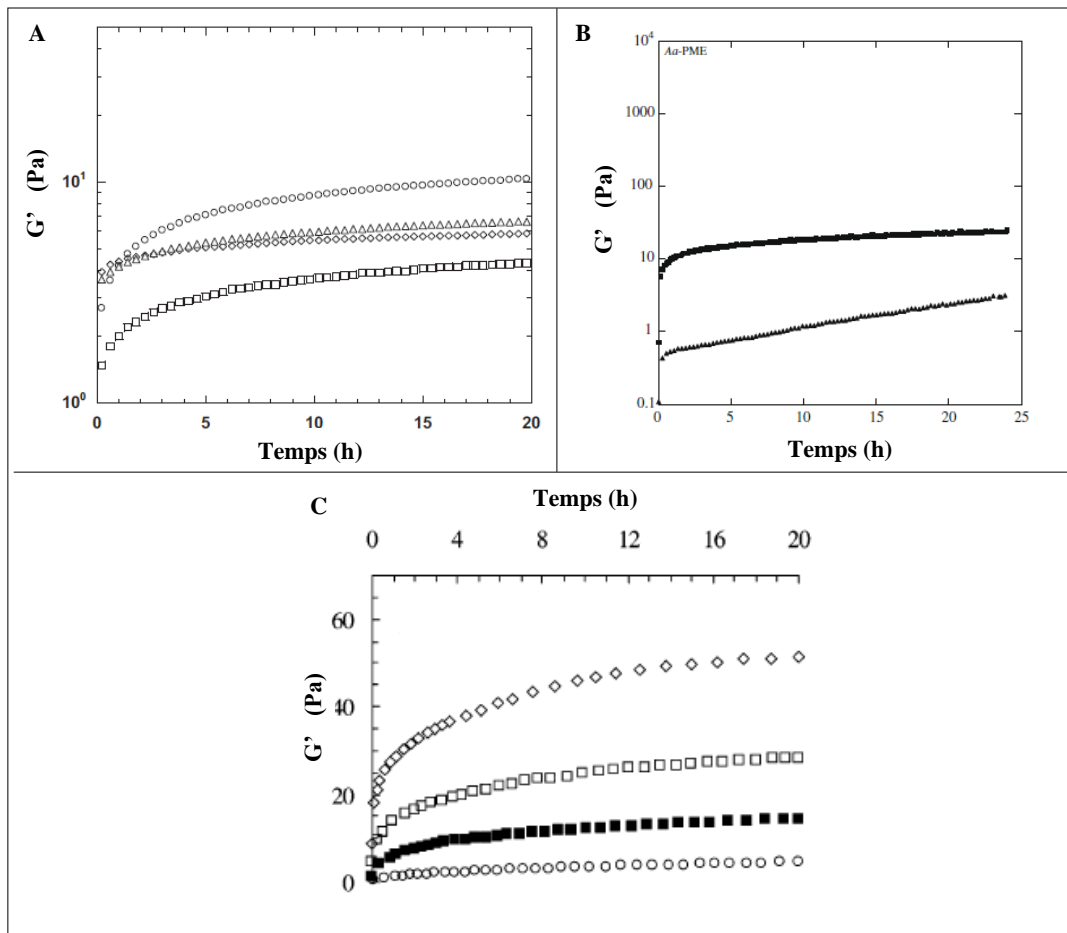


Figure 1.11 : évolution du module de conservation G' lors de la formation de gels de pectines avec des ions calcium dans différentes conditions. Influence de la concentration en pectines (% m/m) : 0,25% \circ , 0,5% \square , 0,75% \diamond et 1% Δ . $[Ca^{2+}] = 3 \text{ mmol/L}$ (Agoda-Tandjawa et al., 2012a) (A). Rôle des PME : ajout d'une PME avant gélification Δ ou au cours de la gélification \blacksquare de pectines de DM initial égal à 71% (Slavov et al., 2009) (B). Rôle de la température de gélification : 5°C \diamond , 12,5°C \square , 20°C \blacksquare et 27,5°C \circ . $[pectines] = 1\%$ et $[Ca^{2+}] = 4,41 \text{ mmol/L}$ (Cardoso et al., 2003) (C).

Pour ces réseaux pectiques, les nœuds de réticulation « boîte à œufs » sont des jonctions physiques qui peuvent évoluer et se réarranger (Kavanagh et Ross-Murphy, 1998). Il est donc difficile de définir une structure précise du réseau. On peut cependant estimer le nombre de jonctions en analysant ses propriétés de gonflement et ses propriétés mécaniques, tel un réseau d'élastomère.

II.2 Propriétés des gels

Une des caractéristiques des gels est de pouvoir absorber de grande quantité de solvant. Cela lui confère des propriétés à la fois de solide et de liquide visqueux. Connaître le taux de gonflement et l'élasticité des gels permet d'établir des relations avec leur structure.

II.2.a Gonflement des gels

D'après Flory et Rehner (1943a), un réseau polymère covalent dans un bon solvant gonfle jusqu'à ce que son extension soit contrebalancée par la résistance due à la réticulation. L'affinité du solvant avec le polymère permet ce gonflement et la réticulation évite la solvation complète du polymère. Ainsi, le réseau gonflé garde une forme proche du réseau non gonflé (Figure 1.12).

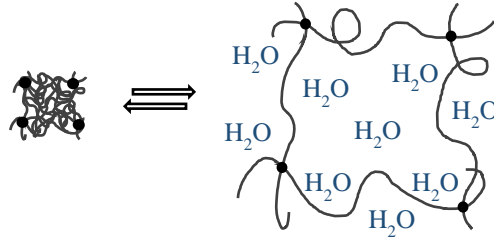


Figure 1.12 : schéma représentant le gonflement réversible d'un hydrogel (adapté de Li et Tanaka, 1992).

Ce comportement est valable dans le cas de liaisons covalentes entre les polymères qui assurent un degré de réticulation fixe. Lorsque le gel est formé par des interactions physiques, le gonflement est aussi dépendant de la réversibilité de ces interactions.

II.2.a.i Gonflement des gels polyélectrolytes

Dans le cas de polyélectrolytes, le gonflement va aussi être dépendant des charges présentes sur le polymère et dans le solvant. Afin d'assurer la neutralité, une différence de pression osmotique se crée entre le polymère et le solvant en raison de l'accumulation de contre-ions au sein du gel, à proximité des macromolécules chargées. Ce dernier gonfle jusqu'à ce que la résistance du réseau contrebalance cette différence de pression osmotique (Kavanagh et Ross-Murphy, 1998; Rose, 2003; Zsivánovits et al., 2005; Vervoort, 2006). Le gonflement est issu d'une pression osmotique au sein du réseau de polyélectrolyte, π_r , qui est décrite par ces trois contributions :

$$\pi_r = \pi_{mel} + \pi_{ion} + \pi_{el} \quad [1.1]$$

Avec π_{mel} , la pression osmotique résultant de l'interaction entre le solvant et le polymère ; π_{ion} , la pression osmotique due à l'accumulation d'ions mobiles dans le réseau polyélectrolyte ; et π_{el} , la pression exercée par l'élasticité du réseau.

$$\pi_{mel} = \frac{RT}{V} \left(\ln \left(1 - \frac{1}{q} \right) + \frac{1}{q} + \chi \frac{1}{q^2} \right) \quad [1.2]$$

$$\pi_{ion} = RT \sum_{ion} (C_{ion}^{gel} - C_{ion}^{sol}) \quad [1.3]$$

$$\pi_{el} = -G \quad [1.4]$$

Avec R, la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T, la température ; V, le volume molaire du solvant ; q, le degré de gonflement $q = \frac{V_{gonflé}}{V_{initial}}$; χ , le paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère ; C_{ion}^{gel} et C_{ion}^{sol} les concentrations d'ions mobiles dans le gel et dans le solvant ; et G, le module dû à l'élasticité du réseau.

Le gonflement atteint l'équilibre quand la pression osmotique dans le réseau est équivalente à la pression osmotique de la solution environnante.

Le terme de pression osmotique du polyélectrolyte, π_{ion} , a été développé plus précisément par Zsivánovits (2005) concernant des gels de pectines :

$$\pi_{ion} = \frac{RT(ic)^2}{2C_s\omega v} \quad [1.5]$$

Avec : i, le degré d'ionisation du polymère ; c, la concentration des unités de répétitions du polymère chargées ; C_s , la concentration ionique issue du sel ; v, le nombre d'ions issus de la dissociation du sel ; ω , la valence de l'électrolyte fort issu du sel. On peut observer qu'en théorie, plus le polymère est chargé et moins la force ionique est forte, plus la pression générée sera forte et plus le réseau gonflera.

Cependant, dans le cas de fortes concentrations en charges, un phénomène de condensation des contre-ions peut mener à un effondrement du réseau dont le gonflement est alors limité (Manning et Ray, 1998; Ryden et al., 2000).

II.2.a.ii Gonflement des gels de pectines

Le gonflement de gel de polyélectrolyte est donc complexe. De plus, dans le cas des gels de pectines réticulés par des ions calcium, la concentration en calcium joue un double rôle dans l'équilibre osmotique : elle modifie la force ionique et contribue aux réticulations. Dans le cas où des ions participent à la réticulation physique des macromolécules, les charges sont neutralisées et ne contribuent plus à pression osmotique ionique. De plus, dans le cas d'un gonflement dans un milieu aqueux, les interactions de type « boîte à œuf » doivent être suffisamment stables pour éviter la solubilisation des pectines.

Le taux de gonflement des gels de pectines dans différents solvants a été déterminé dans quelques études. Ventura *et al.* (2013) observent une diminution du gonflement avec l'augmentation du ratio en calcium. Zsivánovits *et al.* (2004; 2005) observent les mêmes effets pour des matériaux réhydratés dans une solution de PEG permettant de contrôler la pression osmotique à 5 MPa (Figure 1.13). Ces matériaux sont moins gonflés et donc plus concentrés en pectines, et dans des conditions de pression osmotique proches de celle d'une paroi primaire.

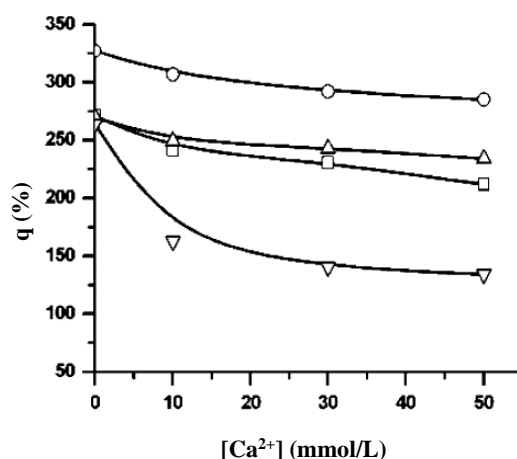


Figure 1.13 : pourcentage de gonflement de films de pectines de différents degré et motifs d'estérification en fonction de la concentration en calcium de la solution d'immersion à une pression osmotique de 5 MPa. (□) Haut DM, motif bloc ; (○) haut DM, motif aléatoire ; (Δ) bas DM, motif bloc ; et (triangle inversé) bas DM, motif aléatoire (Zsivánovits et al., 2005).

Le gonflement des gels réticulés par des ions calcium diminue lorsque la concentration en calcium du milieu de réhydratation augmente. Ce comportement peut résulter soit de la formation de nouvelles jonctions, changeant le taux de réticulation du gel, soit de la pression osmotique générée par les ions calcium.

La force ionique, générée par d'autres ions que le calcium, a aussi un impact sur le gonflement de ces gels (Ryden et al., 2000; Zsivanovits et al., 2004; Sriamornsak et Kennedy, 2008). La réticulation avec le calcium ne neutralise pas l'ensemble des charges du polymère qui agit toujours comme un polyélectrolyte. Dans les études de Ryden *et al.* (2000) et de Zsivanovits *et al.* (2004), les taux de gonflement de gels de pectines diminuent avec l'augmentation de la force ionique (Figure 1.14), en accord avec l'équation [1.5].

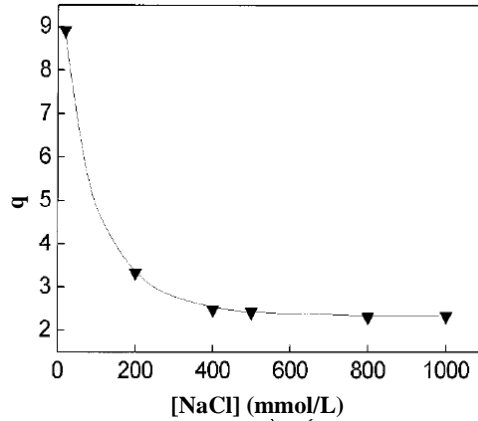


Figure 1.14 : gonflement de pectines de graines de lupin en fonction de la concentration en sel à une pression osmotique constante de 0,4 MPa (Ryden et al., 2000).

Dans l'étude de Sriamornsak et Kennedy (2008), le taux de gonflement est supérieur lorsque les gels de pectines, préalablement réticulés par le calcium, sont immergés dans une solution de NaCl comparé à lorsqu'ils sont immergés dans une solution d'eau pure. L'étude suggère qu'en présence de NaCl, le calcium se libère davantage des interactions avec les pectines. Il en résulte un polymère plus chargé, générant une plus grande pression osmotique dans le gel.

Dans le cas des gels de pectines, leur structure macromoléculaire étant complexe, il est difficile d'établir une relation entre leur gonflement et leurs caractéristiques structurales. Le taux de gonflement aide à comparer qualitativement les gels mais ne permet pas de déterminer un degré de réticulation de façon simple.

II.2.b Élasticité des gels

Les propriétés mécaniques sont aussi dépendantes de la structure du matériau et le taux de réticulation d'un réseau peut être aussi déterminé en mesurant son élasticité.

II.2.b.i Théorie de l'élasticité caoutchoutique

Les gels peuvent subir des grandes déformations sous contrainte et retrouver leur état initial lorsque la contrainte est annulée. Cette propriété macroscopique les rend analogues à un matériau élastomère. On peut alors décrire le comportement mécanique des gels par le biais de la théorie de l'élasticité caoutchoutique (Flory et Rehner, 1943b). Dans le cas idéal le plus simple, on suppose que la déformation est affine (cas des petites déformations), que le volume du gel est constant et que le réseau est parfait, ce qui donne l'expression du module de cisaillement en fonction de la densité de réticulation :

$$G_0 = \nu kT = \frac{\rho RT}{M_c} \quad [1.6]$$

Avec G_0 , le module de cisaillement (en Pa) ; k , la constante de Boltzmann ($k = 1,3801 \cdot 10^{-23}$ J/K) ; ν , la densité de réticulation (en m^{-3}) :

$$\nu = \frac{N_A * \rho}{M_c} \quad [1.7]$$

N_A , le nombre d'Avogadro ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹) ; ρ , la masse volumique du polymère (g/m³) ; et M_c , la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation (g/mol).

L'évaluation des propriétés mécaniques du matériau permettent alors d'estimer indirectement la structure du réseau (Halary et Lauprêtre, 2015) ou inversement. Entre deux systèmes équivalents, le module sera plus élevé pour celui ayant une densité de réticulation plus grande.

Lorsque le réseau est gonflé, la densité de réticulation est diluée. Le module du gel décroît avec l'augmentation du taux de gonflement. En supposant le gonflement isotrope, Flory et Rehner (1943a) définissent, toujours dans le cas idéal, une relation théorique du module en fonction du taux de gonflement par :

$$G = G_0 \left(\frac{1}{q}\right)^{1/3} \quad [1.8]$$

Cette relation est valable pour des chaînes peu étirées. Cependant, expérimentalement, des relations avec une puissance de q supérieure à $-1/3$ sont souvent observées (Dubrovskii et Rakova, 1997). Vervoort (2006) précise que l'impact de la déformation au niveau moléculaire sera différent pour un gel fortement ou faiblement gonflé. En effet, la déformation du gel résulte de la combinaison de la déformation des chaînes macromoléculaires due à la déformation mécanique imposée et de leur déformation résultant du gonflement. Dubrovskii et Rakova (1997) l'ont observé pour des gels de polyacrylamide (Figure 1.15). Le module diminue avec l'augmentation du taux de gonflement puis une inflexion de la tendance se produit et le module augmente avec le taux de gonflement lorsque celui-ci devient très élevé.

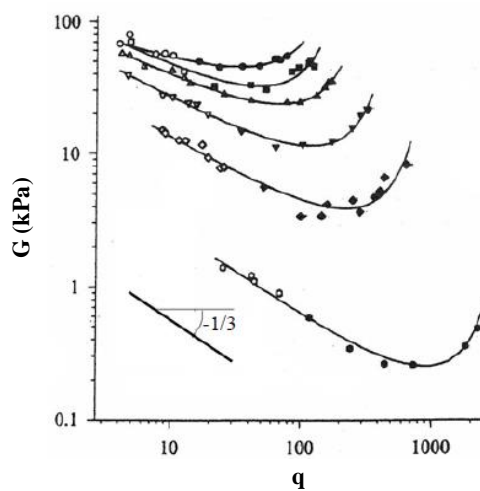


Figure 1.15 : module d'élasticité en fonction du degré de gonflement pour des gels de polyacrylamide avec différentes densités de réticulation et dans différents solvants (Dubrovskii et Rakova, 1997).

Les gels de polyélectrolytes peuvent dévier du cas idéal de Flory et Rehner et le module dépendra alors aussi du degré d'ionisation du réseau.

II.2.b.ii Élasticité des gels de pectines

La plupart des travaux présentés dans la partie concernant le gonflement des gels de pectines se sont aussi intéressés à l'élasticité des gels. Ils ont mesuré les différences de module selon le taux de gonflement et le solvant d'immersion.

II.2.b.ii.1 Gels faiblement concentrés

Les gels de pectines faiblement concentrés ont des modules de l'ordre de quelques pascals, même à faible taux de méthylestérification (Figure 1.11).

La force ionique ayant un impact sur les caractéristiques physico-chimique du gel, elle modifie aussi ses propriétés élastiques. Dans l'étude d'Agoda-Tandjawa et al. (2012a), le module de conservation des gels de pectines réticulées par le calcium est multiplié par 10 en présence de 0,1 mol/L de NaCl dans la milieu de gélification (Figure 1.16).

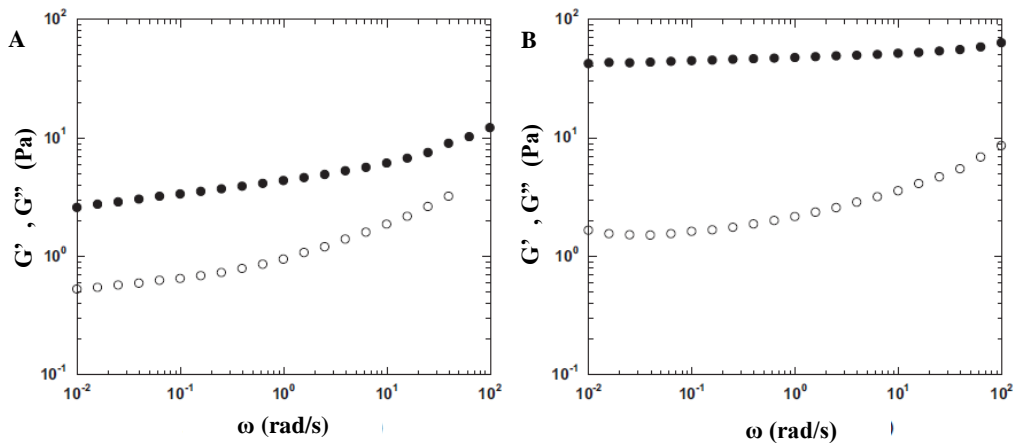


Figure 1.16 : module de conservation G' (●) et de perte G'' (○) de gels pectines – calcium (0,5% (m/m), $[Ca^{2+}] = 3 \text{ mmol/L}$) dans l'eau (A) ou dans 0,1 mol/L de NaCl (B) (Agoda-Tandjawa *et al.*, 2012a).

Les études sur la physico-chimie des pectines sont souvent réalisées sur des solutions peu concentrées en pectines. Les gels formés sont donc peu représentatifs du comportement des pectines dans une paroi végétale, qui est un milieu très concentré en polysaccharides.

II.2.b.ii.2 Gels concentrés

Zsivanovits *et al.* (2004) ont étudié des gels concentrés à au moins 25% en pectines de DM élevé ($\approx 70\%$). Leurs matériaux sont réhydratés dans une solution de PEG permettant de contrôler la pression osmotique à 5 MPa. Grâce à ce contrôle, les taux de gonflements sont peu élevés et permettent de solliciter les échantillons en traction uniaxiale.

Malgré leur faible taux de réticulation, ils présentent de modules entre 15 et 166 MPa qui augmentent avec la concentration en calcium dans le milieu de réhydratation (Figure 1.17). On observe un comportement différent selon l'origine des pectines, malgré un DM comparable. Les gels formés auraient une structure différente, comme le montre les 3 gammes de modules obtenues pour chaque groupe de pectines. Ces pectines ont probablement une distribution des motifs d'estérification différente.

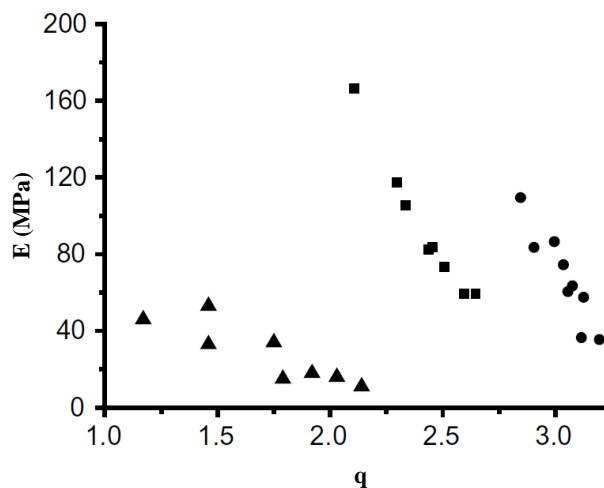


Figure 1.17 : module de traction en fonction du taux de gonflement pour des gels de pectines immergés dans des solutions à différentes concentrations en ions calcium et à une pression osmotique de 5 MPa. Pectines issues d'une déméthylation chimique (●) ; pectines issues d'une déméthylation enzymatique (■) ; pectines de pommes (▲) (Zsivanovits *et al.*, 2004).

Dans cette étude, le module de traction (E) est inversement proportionnel au taux de gonflement. Dans le cas d'un solide incompressible, hypothèse qui peut être faite pour un gel constitué de 90% d'eau, le module de cisaillement G peut être déterminé par l'équation $G = E/3$. Ici, on obtient des relations de G

en fonction du taux de gonflement q avec des puissances largement supérieures à $-1/3$ (Tableau 1.1), contrairement à l'équation théorique [1.8].

Tableau 1.1 : relations des modules de cisaillement en fonction des taux de gonflement, déterminées à partir des données extraites de la Figure 1.17.

Série	Pectines	Relation
●	Déméthylation chimique	$G = G_0 \cdot q^{-9}$
■	Déméthylation enzymatique	$G = G_0 \cdot q^{-9/2}$
▲	Pectines de pommes	$G = G_0 \cdot q^{-9/4}$

L'origine des pectines semble avoir un rôle majeur sur le comportement électrolytique du gel. La distribution des motifs d'estérification, et donc des charges, des polysaccharides en est probablement la raison.

Il est difficile de relier le gonflement des gels de pectines aux caractéristiques du réseau macromoléculaire. La mesure de modules d'élasticité en plus du taux de gonflement peut cependant permettre d'estimer ses caractéristiques et de déduire une relation entre les structures des gels et leurs propriétés. Les caractéristiques du polyélectrolyte, ici les pectines, vont avoir un effet important à la fois sur la formation des jonctions avec le calcium et sur les propriétés du gel à l'équilibre.

II.3 Paramètres influençant les propriétés des gels pectines-calcium

La revue de Fraeye *et al.* (2010b) résume les paramètres impactant les interactions entre pectines et calcium. Les principaux, discutés ici, sont d'ordres structuraux ou bien issus du milieu de gélification. On peut citer la concentration des pectines, leur DM, la distribution des blocs déméthylés, le degré de polymérisation des chaînes, la quantité de calcium ainsi que les propriétés physico-chimiques du milieu de gélification comme étant les principaux paramètres régissant les propriétés des gels. Plusieurs de ces paramètres peuvent être modulés par l'action des enzymes de remodelage des homogalacturonanes.

II.3.a Structure des pectines

La structure des chaînes de pectines assure un rôle fondamental dans la formation des zones de jonctions et donc les propriétés mécaniques des gels. Des structures très variées existent selon les sources de pectines et les modifications enzymatiques et chimiques subies par le polysaccharide.

Le DM est bien sûr un des paramètres les plus influents car il régit le nombre de jonctions maximales possibles dans le réseau. Cependant, quel que soit le DM, la distribution des acides galacturoniques sur la chaîne est plus spécifiquement le paramètre qui va influencer les propriétés des gels (Figure 1.13, Figure 1.18) (Willats *et al.*, 2001; Löfgren *et al.*, 2005; Zsivánovits *et al.*, 2005; Ström *et al.*, 2007; Yapo *et Koffi*, 2013). La nature plus ou moins bloc des pectines va avoir un effet sur la densité de réticulation et la résistance des jonctions formées. Il a été reporté que les gels sont plus élastiques pour des pectines dont le motif d'estérification est plus bloc, en particulier pour des pectines de DM élevé (Zsivánovits *et al.*, 2005; Yapo *et Koffi*, 2013).

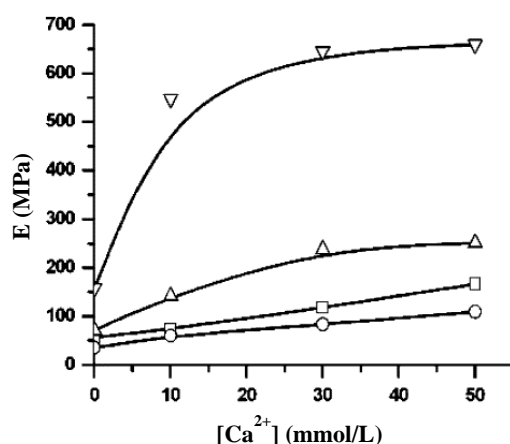


Figure 1.18 : module d'Young de films de pectines de différents degré et motifs d'estérification en fonction de la concentration en calcium de la solution de réhydratation à une pression osmotique de 5 MPa. (□) Haut DM, motif bloc ; (○) haut DM, motif aléatoire ; (Δ) bas DM, motif bloc ; et (triangle inversé) bas DM, motif aléatoire (Zsivánovits et al., 2005).

Ainsi Slavov *et al.* (2009) reportent des modules plus élevés pour des gels formés par réaction avec une PME d'orange par rapport aux gels formés avec une PME fongique dont le mode d'action est aléatoire. La gélification de pectines aux motifs d'estérification aléatoires devient favorable à partir des DM de 40% et inférieurs (Ralet et al., 2003).

Il est aussi nécessaire que le degré de polymérisation (DP) soit suffisamment élevé car au moins deux sites d'interactions par chaînes seraient nécessaires pour obtenir un réseau continu. Kyomugasho *et al.* (2018) forment des gels avec des chaînes d'acide polygalacturonique de minimum 25 kDa de masse molaire en nombre moyenne.

Enfin, les branchements de chaînes de sucres neutres ou les groupements acétyles peuvent induire des défauts de conformation des chaînes de pectines et restreindre les interactions avec les cations. Leur présence semble donc limiter la formation de zones de jonctions (Renard et Jarvis, 1999; Gou et al., 2012). Cependant, les branchements RG sont aussi connus pour interagir entre eux, ce qui crée des connections inter-chaînes supplémentaires dans le gel (Agoda-Tandjawa et al., 2012a). De ce fait, l'impact des branchements sur les propriétés des gels est variable.

La connaissance de la structure des pectines est donc essentielle pour comprendre la structure des gels formés et les propriétés en résultant.

II.3.b Milieu de gélification

Plusieurs paramètres du solvant du gel rentrent en jeu dans les propriétés des gels.

La formation d'un réseau pectines-calcium dépend dans un premier temps de la concentration en pectines et de la concentration en calcium. À basse concentration en pectines, les interactions ont plus de probabilité de se former au sein d'une même chaîne qu'entre plusieurs chaînes. Un ratio, R, correspondant au rapport de deux fois la concentration en calcium sur la concentration en sucres non-méthylés est défini :

$$R = 2 \frac{[Ca^{2+}]}{[-COO^-]} \quad [1.9]$$

En raison de la conformation théorique des chaînes d'acides galacturoniques en hélice 2_1 , un ratio R = 0,5 serait suffisant pour une jonction entre deux chaînes d'acides galacturoniques (Braccini et Pérez, 2001). Ce ratio s'appuie cependant sur un modèle théorique d'interactions entre les chaînes d'acides galacturoniques et Fraeye *et al.* (2010b) reportent une augmentation de la résistance de gels jusqu'à R = 1. Le calcium peut aussi être impliqué dans d'autres interactions et contribuer à la condensation des contre-ions. Ventura *et al.* (2013) ont par exemple reporté une diminution de la concentration en

jonctions rigides relativement à la concentration en chaînes flexibles lorsque R augmente de 0,75 à 3. Une représentation schématique de leur conclusion est donnée en Figure 1.19.

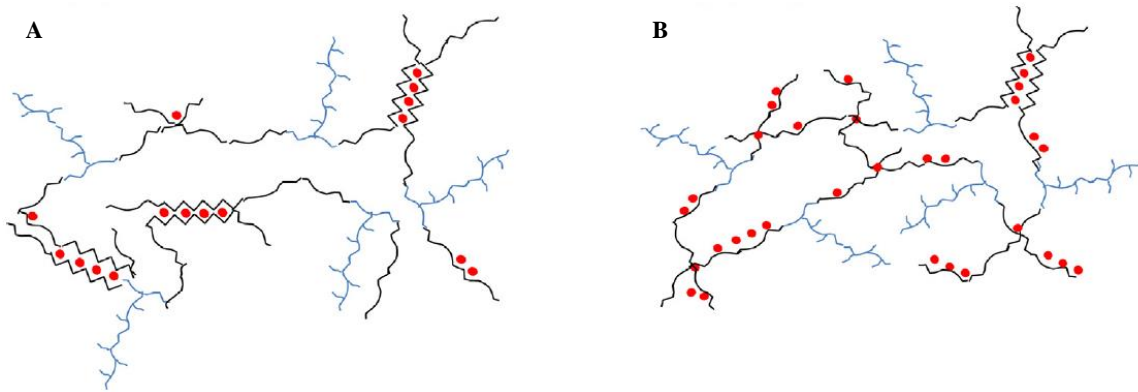


Figure 1.19 : à faible concentration en calcium (A), des jonctions rigides avec le calcium sont formées. À concentration en calcium élevée (B), les ions condensent sur les chaînes de polyélectrolyte et ne participent pas à la formation de jonctions entre chaînes. (Ventura et al., 2013).

Un autre paramètre important de la formation de gels de pectines est le pH. Le pKa des pectines dépend du DM et du DP mais est généralement compris entre 3,5 et 4,1 (Plaschina et al., 1978). À un pH supérieur au pKa, les acides carboxyliques sont sous forme carboxylate ionisée ce qui permet leurs interactions avec les ions calcium (Kyomugasho et al., 2016). Les propriétés des gels de pectines faiblement méthylées reportées ne dépendent pas du pH lorsqu'il est supérieur au pKa. Cependant, selon la concentration ionique du milieu, des pectines faiblement méthylées peuvent adopter une conformation repliée quand le pH augmente (Alba et al., 2018) car les interactions intramoléculaires seront favorisées par rapport aux interactions intermoléculaires.

La force ionique du milieu a une influence majeure sur la gélification. Les ions monovalents ne permettent pas de former des gels forts mais peuvent modifier la gélification ou les propriétés des gels formés avec le calcium. Par exemple, un écrantage des charges des fonctions carboxylates par des ions sodium permet une gélification plus rapide et des gels avec des propriétés élastiques supérieures (Agoda-Tandjawa et al., 2012a) (Figure 1.16).

La caractéristique des pectines de former des gels est très connue mais la présence de ces gels et leur rôle dans l'architecture de la paroi et ses propriétés mécaniques est plus difficile à évaluer. La paroi est en effet un matériau dont la composition est complexe. Les connaissances actuelles sur son architecture et ses propriétés mécaniques et de croissance sont détaillées dans la partie suivante.

III. Architecture, propriétés mécaniques et croissance de la paroi végétale

Les pectines peuvent avoir plusieurs rôles dans la paroi végétale selon leur structure. La modulation de leur gonflement permet d'obtenir des structures plus ou moins denses ce qui modifie à la fois les propriétés mécaniques et la perméabilité de la membrane.

L'architecture exacte de la paroi primaire reste imprécise car les interactions entre fibres et la matrice restent encore peu résolues. Pour simplifier, elle peut être comparée à un composite renforcé par des fibres. Les pectines et le xyloglucane représentent la matrice et les microfibrilles de cellulose des fibres beaucoup plus rigides que la matrice (Burgert et Fratzl, 2009). Différents modèles représentatifs de la paroi sont détaillés dans un premier temps.

Cette structure lui confère une résistance mécanique importante. La paroi végétale est ainsi garante de la résistance des tissus végétaux et donc de la plante. En effet, une plante est soumise à de nombreuses forces et c'est l'addition de la résistance de l'ensemble des parois cellulaires qui lui assure sa tenue mécanique (Burton et al., 2010). La mesure des propriétés mécaniques de paroi est complexe mais certaines des études ayant relevé ce défi sont présentées.

Les modifications enzymatiques rencontrées par les pectines dans la paroi vont moduler cette architecture et ses propriétés mécaniques. Les enzymes de remodelages des pectines et leurs modes d'action sont donc ensuite décrites. Il existe 4 familles d'enzymes agissant sur la structure des pectines : les pectines-méthylestérases (PME), les pectines-acétylestérases (PAE), les polygalacturonases (PG) et les pectines-lyases (PL). Certaines enzymes de ces familles ont été étudiées *in planta* ou sur des solutions de pectines. Leurs caractéristiques, spécificités et modes d'action sont discutés et mis en relation avec la modification des propriétés des pectines.

Il est admis que ces bouleversements structuraux ont un lien avec la croissance de la paroi. Une paroi primaire croît par ajout de nouveaux polysaccharides mais aussi par extension. Le lien entre les propriétés de la paroi et sa croissance sont encore difficiles à comprendre mais différentes études ont proposé des modélisations de ces phénomènes. Celle-ci seront discutées à la fin de cette partie.

III.1 Modèles d'architecture de la paroi primaire

Un modèle permet d'expliquer visuellement un système complexe. Pour la paroi végétale, plusieurs représentations ont été proposées afin de mieux comprendre les interactions entre ses constituants ainsi que le lien entre la structure de la paroi et ses mécanismes d'élongation. Les premiers modèles résultent des caractérisations des polysaccharides extraits des parois et d'observations en microscopie. Les avancées techniques en RMN de l'état solide ont depuis contribué à remettre en cause certains principes de ces premiers modèles.

III.1.a Modèles issus de caractérisations biochimiques

Un des premiers modèles, proposé par Albersheim, considère que les pectines sont liées de façon covalente au xyloglucane par les chaînes d'arabinoses (Keegstra et al., 1973) (Figure 1.20). Le xyloglucane est lui complètement adsorbé sur les microfibrilles. Des protéines, considérées comme ayant un rôle dans la croissance de la paroi, comme par exemple les expansines, sont également intégrées dans le modèle.

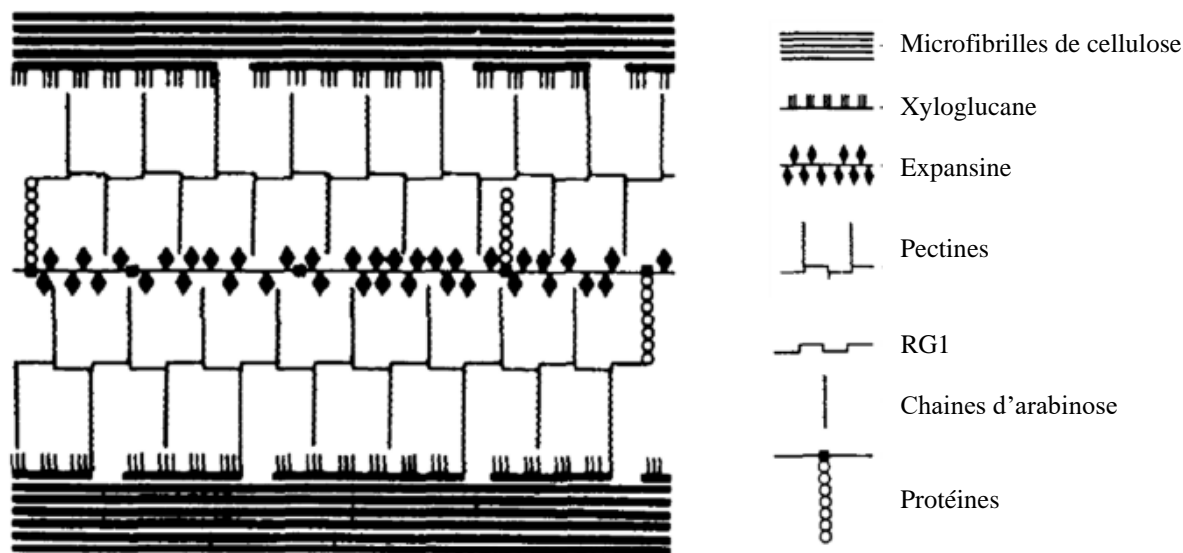


Figure 1.20 : représentation schématique d'Albersheim d'une paroi primaire (d'après Keegstra et al., 1973).

Une meilleure connaissance de la structure des polysaccharides et l'observation de parois à l'aide de la microscopie électronique ont permis à Carpita et Gibeaut (1993) et à McCann et Roberts (1994) de proposer un modèle plus évolué (Figure 1.21).

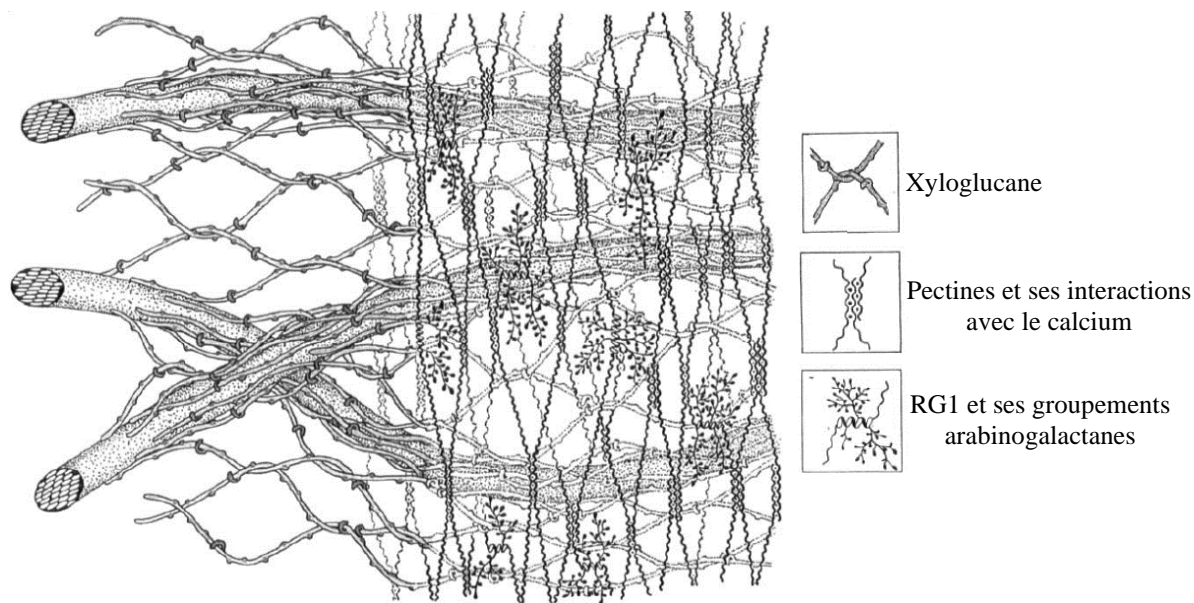


Figure 1.21 : représentation schématique d'une paroi primaire (d'après Carpita et Gibeaut, 1993).

Ils rapportent qu'au moment de leur dépôt, les microfibrilles sont alignées aléatoirement mais qu'elles ont tendance à s'orienter dans l'axe de l'élongation ensuite. Dans ce modèle, l'espacement entre les microfibrilles est maintenu grâce au réseau formé avec le xyloglucane, qui n'est pas complètement adsorbé sur les microfibrilles et permet d'éviter une agglomération des fibrilles. Le réseau pectique est ici indépendant du réseau cellulose-xyloglucane. Ce dernier est vu comme le garant de la résistance de la paroi tandis que le réseau pectique assure le contrôle de la porosité. Cosgrove (2000) nuance ce modèle en considérant les pectines comme assurant des jonctions entre différentes couches de fibrilles de celluloses, celles-ci étant recouvertes de xyloglucane.

Des études immunologiques ont localisé les différents groupes de pectines dans des zones spécifiques de parois primaire de cellules de d'érable sycomore (Somerville et al., 2004). Près de la membrane plasmique, des pectines plutôt riches en RG II seraient présentes tandis que les pectines riches en HG se

trouveraient plutôt aux abords de la lamelle moyenne (Figure 1.22). Les pectines riches en RG1 semblent être réparties dans l'ensemble de la paroi. Un modèle prenant en compte ces considérations est réalisé par Somerville (2004). Il traduit la complexité de ce système.

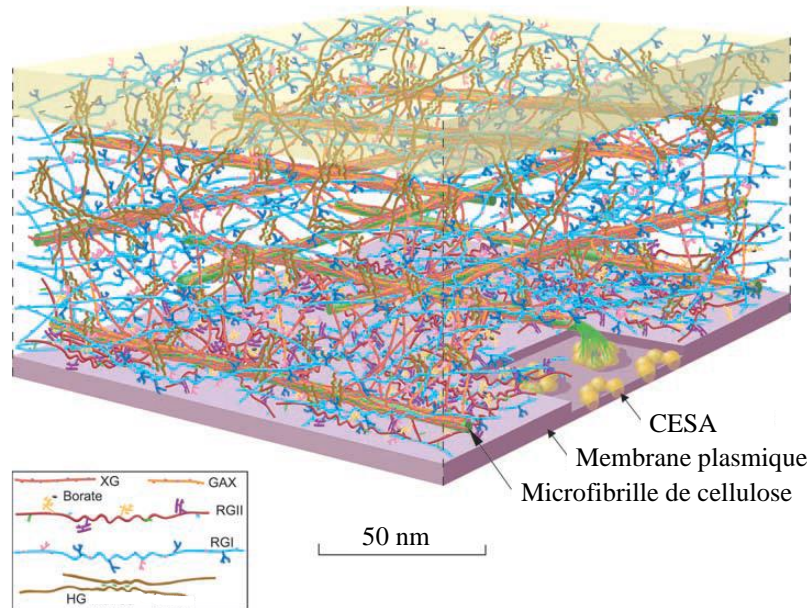


Figure 1.22 : représentation schématique d'une paroi primaire (d'après Somerville et al., 2004).

III.1.b Modèles issus de caractérisations structurales par RMN

En raison de ses capacités d'adsorption avec la cellulose *in vitro*, le xyloglucane a longtemps été considéré comme garant de la structure de la paroi végétale. Dans les modèles précédents, le xyloglucane espace les microfibrilles tout en les reliant. Plus récemment, Cosgrove (2014) a proposé un modèle prenant en compte de nouvelles connaissances sur les interactions entre les polysaccharides de la paroi.

Plusieurs avancées en RMN ont révélé que seulement une petite portion de xyloglucane est en contact avec la cellulose alors qu'environ 50% de la cellulose est au contact proche des pectines, pour des parois d'*Arabidopsis* (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et Hong, 2016). Les pectines restent cependant les polysaccharides ayant le plus de mobilité dans la paroi. Aussi, des études sur des plants mutants ont montré le maintien d'une structure pariétale en l'absence d'un réseau cellulose-xyloglucane (Peaucelle et al., 2012). Cela montre la capacité des pectines à contribuer aux propriétés mécaniques de support de la paroi.

En parallèle, des observations par microscopie à champ proche (AFM) de parois végétales ont permis de montrer la présence de zones de contact nombreuses entre microfibrilles de cellulose (Zhang et al., 2014). Cela met en avant les limites des modèles précédents qui affirmaient que le xyloglucane empêchait le contact entre des microfibrilles. Le concept de « biomechanical hot spot » est introduit pour définir les zones d'interactions des microfibrilles de cellulose, zones qui pourraient jouer un rôle dans les propriétés de la paroi. Un modèle permettant de visualiser ces zones d'interactions est réalisé à partir des images AFM de paroi primaire de cellules d'oignon permettant de visualiser les microfibrilles (Zhang et al., 2014).

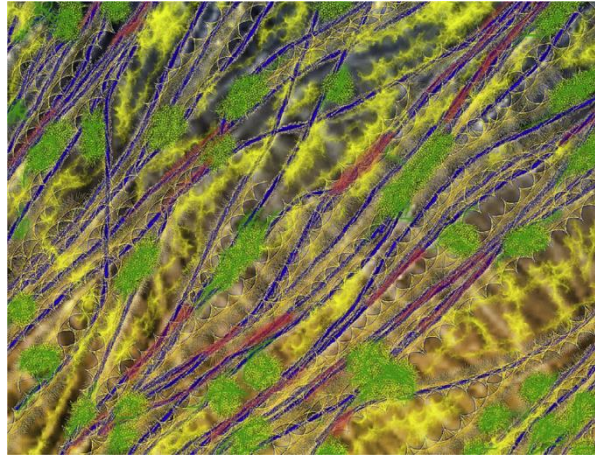


Figure 1.23 : schématisation d'une paroi primaire à partir d'une image issue de microscopie AFM de Zhang et al. (2014) permettant de visualiser les microfibrilles de cellulose. Celles-ci sont représentées en bleu avec en rouge leurs zones de contact (« biomechanical hot spot »), les xyloglucanes sont représentés en vert et les pectines en jaunes (Cosgrove, 2014).

Dans la Figure 1.23, les microfibrilles de celluloses sont représentées en bleu, les « hot spot » en rouge, le xyloglucane en vert et les pectines en jaune. Dans ce modèle, le xyloglucane adopte une conformation de pelote aléatoire qui s'adsorbe seulement sur une petite zone de microfibrille. Les pectines, occupant le reste de l'espace, ont donc plus de zones de contact disponibles avec la cellulose.

L'architecture de la paroi joue un rôle majeur dans le contrôle et la modulation de ses propriétés mécaniques. Comme décrit plus haut, le xyloglucane est connu pour s'adsorber sur la cellulose. Ce phénomène a longtemps été supposé être à l'origine du peu d'agrégation des microfibrilles. Le xyloglucane était aussi vu comme le polysaccharide contribuant à créer un réseau interconnecté entre les microfibrilles. Ces hypothèses ont été remises en cause depuis quelques années par des analyses RMN et AFM montrant peu de contact entre la cellulose et le xyloglucane et au contraire beaucoup de contacts entre les microfibrilles.

La place des pectines dans ces modèles n'est pas certaine. Sa proximité avec la cellulose peut être expliquée par la présence d'interactions physiques réelles, plus probablement avec les groupes RG1 (Wang et Hong, 2016). De récentes études ont montré la possibilité d'organisation des pectines sous forme de nanofilaments au sein de la paroi (Haas et al., 2020). Le comportement des pectines est beaucoup étudié car leurs propriétés complexes sont intéressantes pour de nombreux domaines.

III.2 Propriétés mécaniques de la paroi

Les parois cellulaires doivent être suffisamment rigides pour assurer un maintien face à la pression de turgescence et autres contraintes et à la fois flexibles pour permettre l'allongement de la cellule. Le module d'élasticité permet de comparer facilement les propriétés de matériaux entre eux.

III.2.a Module d'élasticité des parois primaires

La paroi est un réseau polymère de trois types de polysaccharides contribuant différemment aux propriétés. Individuellement, la cellulose est le composant le plus rigide grâce à sa structure semi-cristalline. Le module des microfibrilles est de l'ordre de 100 Gpa (Favier, 1995) tandis que le xyloglucane et les pectines ont des modules de l'ordre de quelques dizaines de mégapascals. Ces derniers apporteraient donc plutôt une contribution visqueuse. Mais les propriétés de la paroi, et en particulier son élasticité, sont majoritairement dépendantes des interactions entre ces trois composants. L'architecture exacte de la paroi n'étant pas complètement résolue, son comportement visco-élastoplastique n'est pas connu théoriquement (Cosgrove, 2018).

Des mesures de modules ont été réalisées sur différents types de parois végétales. Une revue bibliographique rassemble l'ensemble des études sur le sujet (Bidhendi et Geitmann, 2019). Avec des essais de traction ou de fluage, des modules de 10 MPa à quelques gigapascals ont été reportés (Mirabet et al., 2011; Bidhendi et Geitmann, 2019). Les modules les plus élevés proviennent de parois qui ont

d'abord été séchées avant d'être réhydratées, et on peut donc supposer que le séchage implique des modifications structurales irréversibles impactant les propriétés mécaniques.

Concernant les matériaux caractérisés sans étape de séchage (Tableau 1.2), les modules sont de l'ordre de quelques dizaines de mégapascals pour des tissus entiers mais semblent plus élevés pour des parois isolées. Une des explications suggère que lors de la mesure sur des tissus entiers, la cohésion entre les cellules impacte les performances mécaniques du tissu. Ces valeurs reflètent donc moins les propriétés de la paroi en elle-même. Cependant, la mesure d'un module de traction d'une seule paroi requiert une grande précision et peu d'études ont pour l'instant relevé ce défi.

Tableau 1.2 : exemples de modules mesurés par essai de traction uniaxiale sur des tissus ou des parois végétales à l'état hydraté (d'après Bidhendi et Geitmann, 2019).

E (MPa)	Type de tissus	Vitesse de traction (mm/s)	Référence
17,5	Épiderme d'oignon	1	(Vanstreels et al., 2005)
15	Épiderme d'oignon	0,02	(Bidhendi et Geitmann, 2019)
20	Hypocotyle	0,01 – 0,015	(Abasolo et al., 2009)
25	Hypocotyle	0,03	(Ryden et al., 2003)
10 – 47	Hypocotyle	0,01	(Saxe et al., 2016)
16	Hypocotyle	0,015	(Cavalier et al., 2008)
374,6	Paroi d'épiderme d'oignon	NC	(Zamil et al., 2015)
311	Paroi de cellule de <i>Chara</i>	NC	(Wei et al., 2006)

Cette disparité entre les résultats peut aussi être issue des différences dans les types de tissus utilisés et les techniques expérimentales mais aussi des difficultés liées à la manipulation de parois ou de tissus.

L'AFM et d'autres techniques de nano-indentation sont aussi utilisées depuis plusieurs années pour essayer d'évaluer les propriétés mécaniques de la paroi plus facilement. Les modules obtenus varient de 0,01 MPa à 10 MPa selon le type de cellule et la sonde utilisée (Bidhendi et Geitmann, 2019; Navon, 2020). Le module mesuré en indentation est différent du module de traction car la paroi est un matériau anisotrope (Bidhendi et Geitmann, 2019). La rigidité dépend aussi de l'orientation des microfibrilles et celle-ci implique une anisotropie entre le module longitudinal et les modules transversaux. Lors d'essai de traction, les microfibrilles sont sollicitées en traction également alors que lors d'essais en nanoindentation, les microfibrilles sont sollicitées en flexion.

Des études montrent que pour des parois de cellules d'épidermes d'oignon, les mesures par nano-indentation reflèteraient plus les propriétés de la matrice de pectines (Cosgrove, 2018; Zhang et al., 2019) tandis les propriétés en traction résulteraient du réseau de microfibrilles (Zhang et al., 2019). On peut aussi supposer que les connections entre microfibrilles de cellulose, observées dans des parois jamais séchées (Zhang et al., 2014), apportent de la rigidité à la structure lors de sollicitation en traction.

Les contributions des différentes interactions restent cependant difficiles à estimer. Abasolo *et al.* (2009) ont observé que le réseau pectique influençait la déformation plastique des parois en limitant le déploiement des macromolécules de xyloglucane.

Comme le montre la variété des études référencées par Bidhendi et Geitmann (2019), il est difficile d'estimer précisément le module d'élasticité des parois. L'architecture de la paroi primaire a une influence majeure sur les propriétés mécaniques des cellules et des tissus, bien que le rôle des différentes interactions moléculaires dans le comportement de la paroi soit encore peu compris. De plus, la paroi primaire présente différentes propriétés mécaniques. Elle doit se comporter comme un solide élastique pour résister aux forces de turgescence mais pendant la croissance cellulaire, la paroi doit être suffisamment plastique pour permettre l'extension de la cellule.

III.2.b Modélisation du comportement mécanique d'une paroi

Leurs propriétés sont difficiles à évaluer avec les outils de caractérisation des matériaux et une simple mesure de module ne permet pas de décrire le comportement du matériau en détails. En effet, la paroi est un matériau à la fois élastique, visqueux et plastique (Taiz, 1984; Kaplan et al., 2019). Afin de mieux comprendre le comportement mécanique de la paroi, plusieurs études ont tenté de le modéliser.

Une approche simplifiée de la réponse à la pression de turgescence, reprenant ces trois concepts, a été initialement proposée par Lockhart (1965) et par Ortega (1985). Dans ce modèle (Figure 1.24), une pression seuil va induire une déformation plastique irréversible correspondant à l'allongement de la paroi. En dessous de cette pression seuil, la paroi se comporte seulement comme un solide viscoélastique.

$$\frac{1}{l} \frac{dl}{dt} = m(P - P_y) + \frac{1}{E} \frac{dP}{dt}, P > P_y \quad [1.10]$$

$$\frac{1}{l} \frac{dl}{dt} = \frac{1}{E} \frac{dP}{dt}, P < P_y \quad [1.11]$$

Avec P_y , la pression seuil, m un facteur d'extensibilité de la paroi prenant en compte sa vitesse de croissance et E le module d'élasticité de la paroi.

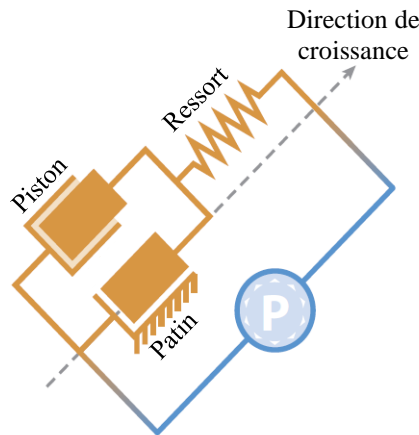


Figure 1.24 : représentation schématique du modèle d'Ortega (1985) des éléments mécaniques permettant de décrire simplement une paroi soumise à la pression de turgescence. Le ressort représente la contribution élastique, le piston, la contribution visqueuse et le patin, le seuil de plasticité (Ali et al., 2014).

La modélisation du comportement viscoélastique des parois est complexe. Les mesures de relaxation de contrainte ou de fluage sont des méthodes communes pour évaluer la viscoélasticité des matériaux et ont été utilisées sur des parois végétales (Hansen et al., 2011). La première consiste à appliquer et à maintenir une déformation et à mesurer l'évolution de la contrainte au court du temps, tandis que la deuxième consiste à appliquer et maintenir une contrainte et mesurer l'évolution de la déformation. Pour un matériau dont la viscoélasticité est linéaire, la grandeur mesurée sera uniquement dépendante du temps. Un temps caractéristique de relaxation ou de fluage permet de caractériser la composante visqueuse du matériau. Les parois primaires ne se comportent pas comme des matériaux viscoélastiques linéaires car différentes natures d'interaction sont responsables de la résistance de ce matériau.

Des mesures de relaxation de parois végétales ont mené à une expression empirique de l'évolution de la contrainte (Taiz, 1984).

$$\sigma(t) = b \log\left(\frac{t+T_m}{t+T_0}\right) + c \quad [12]$$

Avec b , une vitesse de relaxation ; T_0 , le temps de relaxation minimum ; T_m , le temps de relaxation maximum ; et c , la contrainte résiduelle à la fin de la relaxation. Ces paramètres sont dépendants des propriétés des réseaux macromoléculaires impliqués.

Des essais de relaxation sur des films composés uniquement de pectines ont permis de montrer une dispersion des temps de relaxation, pouvant s'exprimer sous la forme :

$$\sigma(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)^\beta\right) \quad [1.12]$$

Avec $\sigma(t)$, la contrainte à l'instant t ; τ_0 , un temps de relaxation ; et β , le paramètre traduisant la dispersion des temps de relaxation (Zsivanovits et al., 2004). Cette dispersion laisse penser que des phénomènes de réarrangement du réseau pectique ont lieu lors de la sollicitation. Le rôle que pourrait avoir les autres composants pariétaux dans ces phénomènes n'est cependant pas évalué.

De plus, les propriétés mécaniques de la paroi évoluent au cours de la croissance et peuvent être modulées par des modifications architecturales. L'évolution de la structure des pectines par réactions enzymatiques est une des modifications majeures au cours de la croissance.

III.3 Enzymes de remodelage des homogalacturonanes

Les pectines sont initialement synthétisées dans les vésicules de Golgi avec un DM élevée (Mohnen, 2008). Des enzymes présentes dans la paroi assurent leurs modifications au cours de la croissance de la cellule. On s'intéresse ici en particulier aux enzymes agissant sur la partie homogalacturonane, la partie la plus abondante des pectines chez les dicotylédones. Ces modifications structurales semblent jouer un rôle important dans la croissance de la cellule végétale, en modulant les propriétés mécaniques de la paroi.

Les plus étudiées sont les méthylestérases (PME), enzymes qui réduisent le degré de méthylation (DM) des pectines. On peut aussi parler des acétylestérases (PAE) qui éliminent les groupements acétyles, et des polygalacturonases (PG) et pectines lyases (PL) qui réduisent leur degré de polymérisation (DP). Ces enzymes appartiennent toutes, dans de nombreuses espèces, à de larges familles multigéniques. C'est-à-dire que des enzymes catalysant la même réaction mais issues de gènes différents co-existent et ont des caractéristiques différentes.

III.3.a Enzymes de modifications structurales

Deux types d'enzymes agissent sur les groupements fonctionnels acétyles ou esters des homogalacturonanes. Les déacétylations et déméthylations peuvent conduire à des changements d'interactions entre les macromolécules de pectines ou bien à rendre le substrat plus attractif pour des enzymes de dégradation.

III.3.a.i Acétylestérases de pectines (PAE)

Les homogalacturonanes peuvent être acétylés sur les oxygènes en position C2 ou C3 du cycle mais ce groupement est présent sur moins de 10% des sucres et n'est pas réparti de façon homogène. Les acétylestérases de pectines (PAE) (EC 3.1.1.6) catalysent l'hydrolyse de la liaison de ce groupement (Sénéchal et al., 2014). L'acétylation des pectines peut influencer les autres activités enzymatiques et il est supposé que les PAE agissent en synergie avec les autres enzymes. Il a été montré que la déacétylation contribuait à l'amélioration des réactions de dégradation enzymatique des pectines.

III.3.a.ii Méthylestérases de pectines (PME)

Les méthylestérases de pectines (PME) (EC 3.1.1.11) catalysent l'hydrolyse de la liaison méthylester du C6 d'un sucre galacturonane, produisant un acide galacturonique et du méthanol (Jolie et al., 2010) (Figure 1.25). Un mécanisme d'attaque nucléophile sur le carbonyle a été proposé en se basant sur la structure cristalline de quelques PME.

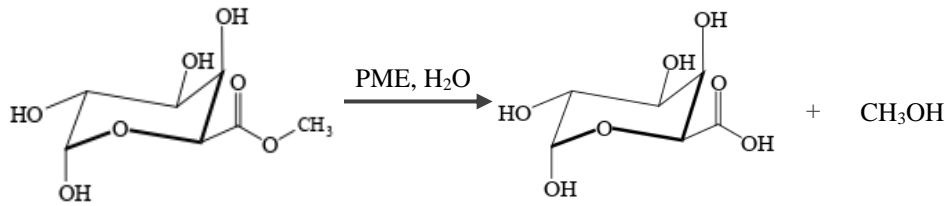


Figure 1.25 : schéma de réaction de déméthylation d'un monomère galacturonane par une PME.

On retrouve les PME dans les plantes mais aussi dans des micro-organismes bactériens et fongiques. Les PME sont nombreuses dans les parois de dicotylédones. Dans *Arabidopsis thaliana* par exemple, 66 isoformes de PME ont été identifiées (Pelloux et al., 2007; Sénéchal et al., 2014). Il existe des PME acides, basiques ou neutres selon la structure de la protéine et le point isoélectrique en résultant. Le pH d'activité optimale varie donc de 1 à 10 selon l'enzyme (Jolie et al., 2010).

III.3.a.ii.1 Modes d'action des PME

Plusieurs modes d'action ont été identifiés. Deux mécanismes conduisent à une déméthylestérification processive, formant de larges zones déméthylées appelées « blocs » : un mécanisme mono-chaine (« single-chain ») et un mécanisme d'attaques multiples (« multiple-attack »). Dans le premier cas, l'enzyme déméthyle tous les esters consécutifs d'une chaîne d'homogalacturonane avant de s'en dissocier. Dans le deuxième cas, la PME catalyse la réaction de façon processive sur un nombre limité d'ester avant de s'en dissocier (Salas-Tovar et al., 2017). Les PME basiques (végétales et bactériennes) agiraient plutôt selon ce mode d'action.

Un troisième mode d'action existe, le mécanisme à chaînes multiples (« multiple-chain »). Il est plutôt associé aux PME acides (fongiques principalement et quelques PME végétales). Dans ce cas, l'enzyme déméthyle un seul ester avant dissociation, ce qui conduit à un motif de déméthylation aléatoire.

III.3.a.ii.2 Impact des conditions de réactions sur le mode d'action

Ces modes d'actions peuvent cependant évoluer pour une même enzyme selon les conditions de réaction. Il a été reporté pour des PME de *Vigna radiata* (Catoire et al., 1998), de pommes (Denès et al., 2000) et d'*Arabidopsis thaliana* (Hocq et al., 2021) que le mode d'action de l'enzyme passe de processif à aléatoire selon le pH de la solution.

La concentration en cations de l'environnement (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Fe³⁺, Al³⁺) semble aussi avoir un rôle sur l'activité et le mode d'action des PME (Christgau et al., 1996; Goldberg et al., 1992; Jolie et al., 2010; Nari et al., 1991). Les charges présentes au sein des protéines et sur les pectines peuvent défavoriser l'interaction entre les deux molécules. Certains cations, jusqu'à une concentration optimale, semblent alors faciliter la réaction.

Le motif d'estérification est aussi un paramètre important dans la réactivité de l'enzyme à la fois directement et indirectement lorsque des jonctions calciques sont formées. La présence d'un acide carboxylique libre dans le site actif de l'enzyme semble nécessaire à la réaction car les PME réagissent préférentiellement avec des pectines partiellement méthylées (Jolie et al., 2010). Aussi Videcoq *et al.* (2011) ont montré que la présence de jonctions calcium diminuait la processivité d'une PME d'orange. Cela n'avait cependant pas d'impact sur l'activité d'une PME fongique montrant une fois de plus les différences de comportement entre différents isoformes.

Aussi, l'activité des PME est généralement étudiée sur des solutions de pectines. Or la composition de la paroi peut jouer un rôle dans la modulation du mode d'action des PME. Slavov *et al.* (2009) ont montré que deux types de PME, une fongique et une d'orange, avaient un mode d'action plus processif sur des gels de pectines qu'en solution. Une modification de la processivité d'une PME fongique a aussi été observée en présence de 1,5% de microfibrilles de cellulose dans un gel de pectines (Bonnin et al., 2015, 2019). La diffusion de la PME est aussi plus rapide comparé aux gels sans cellulose. Celle-ci permettrait d'obtenir un gel avec une plus grande porosité, favorisant la diffusion de l'enzyme. La diffusion peut aussi être dépendante de l'enzyme (Videcoq et al., 2013).

III.3.a.ii.3 Régulation de l'activité des PME au sein de la paroi

Différentes PME sont sollicitées dans différents organes de la plante et il est probable que différentes PME soient impliquées selon les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement des pectines et selon les caractéristiques structurales des homogalacturonanes. Leur activité peut aussi être régulée par des inhibiteurs protéiques appelés PMEI ou par d'autres molécules (acide polygalacturonique, sucrose, glycérol, tannin,...) (Jolie et al., 2010).

Les PME semblent particulièrement impliquées dans la croissance des cellules de différents organes, comme par exemple dans l'élongation des cellules d'hypocotyles (Pelletier et al., 2010). Le contrôle du degré de méthylation (DM) par la plante peut avoir pour but de rigidifier la paroi par la création d'interactions avec le calcium. Dans d'autres références, la réactivité des PME a aussi été associée à un affaiblissement de la paroi car une fois déméthylestérifiées, les pectines deviennent des substrats privilégiés par les polygalacturonases et les lyases.

III.3.b Enzymes de dégradations

Les polygalacturonases (PG) et les lyases de pectines (PL) sont également présentes dans des micro-organismes en plus des plantes. Elles sont aussi issues de grandes familles multigéniques. Leur rôle consiste à réduire les macromolécules de pectines en monosaccharides et/ou en oligomères. Ces derniers peuvent avoir un rôle signalétique permettant à la cellule d'actionner des mécanismes de réaction face à ces changements structuraux.

III.3.b.i Polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) catalysent l'hydrolyse de la liaison α -1,4 entre deux monosaccharides de la chaîne d'homogalacturonane (Sénéchal et al., 2014). Deux types de PG existent : les endo-PG (EC 3.2.1.15) et les exo-PG (EC 3.2.1.67).

Les endo-PG agissent de façon aléatoire ce qui conduit à des oligomères de tailles variées. Elles coupent la liaison entre deux sucres non-méthylés et nécessitent la présence d'au moins 4 monosaccharides non méthylés. Son activité est donc dépendante des motifs d'estérification des pectines. Les exo-PG hydrolysent seulement la liaison du sucre terminal de la chaîne d'homogalacturonane. Elles libèrent donc uniquement des monosaccharides.

Leur activité augmente quand le DM des pectines diminue. Le pH et la présence d'ions ont également un impact sur leur activité.

III.3.b.ii Lyases

On distingue les lyases de pectines (PNL) (EC 4.2.2.10) et les lyases de pectates (PL). Les PNL ont un mode d'action uniquement de type endo. Mais il existe des endo-PL (EC 4.2.2.2) et des exo-PL (EC 4.2.2.9). Ces enzymes catalysent la rupture par β -élimination de la liaison α -1,4 entre les acides galacturoniques (méthylés ou non) d'une chaîne d'homogalacturonane. Il en résulte une insaturation entre le C4 et le C5 du sucre terminal de l'oligomère formé.

Les PNL dégradent plutôt les pectines de DM élevé et les PL dégradent plutôt les pectines de faible DM. Ces dernières ont aussi la particularité de nécessiter la présence d'ions calcium et d'être actives de façon optimale à un pH basique (8,5), contrairement au PNL qui ont une activité optimale à un pH de 5,5 (Sénéchal et al., 2014).

Le contrôle et la régulation fine de la structure des pectines impliquent la participation de plusieurs enzymes mais le mécanisme de cette régulation reste encore peu compris. De plus, l'activité de ces enzymes est modulée par de nombreux facteurs tels que des hormones, des inhibiteurs et les caractéristiques physico-chimique de la paroi. Plusieurs hypothèses concernant l'élongation de la paroi s'intéressent aux rôles de ces modifications enzymatiques.

III.4 Élongation de la paroi végétale

Une cellule végétale croît par extension de sa paroi. En simultanément, un apport continu de polysaccharides permet de maintenir l'épaisseur de la paroi au cours de la croissance.

Les modulations de propriétés mécaniques sont étroitement liées à son processus de croissance (Boudaoud, 2010; Bidhendi et Geitmann, 2018). Par exemple, une hypothèse atteste qu'elles peuvent être à l'origine des processus d'insertion de nouveaux composants dans la paroi (Ali et Traas, 2016).

L'extension de la paroi nécessite la modification de ses propriétés mécaniques qui passe par une évolution de l'architecture pariétale. Chaque polysaccharide et leurs interactions jouent différents rôles dans son évolution. L'extension résulte en grande partie de processus de relâchement de la paroi face à la pression de turgescence, schématisé dans la Figure 1.26.

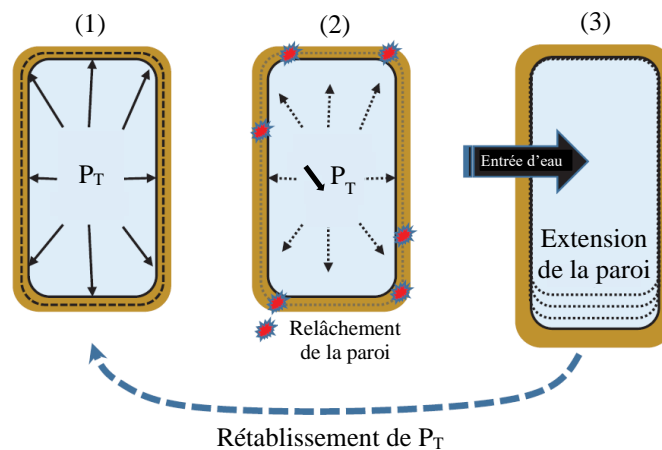


Figure 1.26 : schéma simplifié du processus d'extension suite à la contrainte induite par la pression de turgescence P_T (d'après Cosgrove, 2016).

III.4.a Direction de croissance

La pression de turgescence est isotrope mais la croissance en réponse est anisotrope (Baskin, 2005). Cette réponse anisotrope est en partie liée à l'orientation des microfibrilles de cellulose (Mirabet et al., 2011; Haas et al., 2020). Des microtubules permettent de contrôler la position des CESA et l'orientation de la cellulose au moment de sa synthèse (Burgert et Fratzl, 2009).

Kafle *et al.* (2014) ont ainsi montré l'évolution de l'orientation des microfibrilles de cellulose à différents stades de croissance (Figure 1.27). Les cellules les plus récemment formées montrent une orientation désorganisée des fibrilles (image d). Les histogrammes montrent la distribution angulaire des fibrilles évoluant au cours de leur vieillissement, la 2^{ème} couche étant constituée des cellules les plus vieilles. Ces observations ont aussi été réalisées au sein d'une même paroi (Yilmaz et al., 2020).

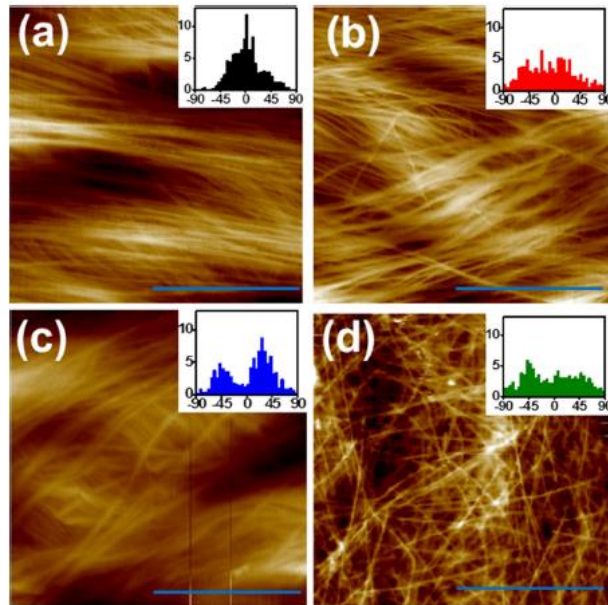


Figure 1.27 : topographie AFM permettant de visualiser l'orientation des microfibrilles de cellules d'oignon de la 2ème couche (a), 5ème couche (b), 8ème couche (c) et 11ème couche (d) (bar d'échelle = 0,5 μm) (Kafle et al., 2014).

III.4.b Hypothèses du rôle des modifications structurales du xyloglucane

D'après les premiers modèles de parois végétales (Figure 1.20, Figure 1.21), le xyloglucane forme un réseau par interactions avec les microfibrilles de cellulose. L'allongement de la paroi nécessiterait donc la modification de ce réseau et plusieurs molécules ont été identifiées comme agissant soit sur le xyloglucane soit sur ses interactions avec les microfibrilles.

Des expériences ont montré une relation entre croissance et des protéines d'expansines, de xyloglucanases ou encore d'endotransglycosylases (Chanliaud et al., 2004; Cosgrove, 2005). Les expansines sont des protéines non enzymatiques qui agiraient sur les interactions entre les microfibrilles de cellulose et les molécules de xyloglucane, à pH acide (McQueen-Mason et al., 1992). Les deux autres familles d'enzymes modifieraient la structure des molécules de xyloglucane conduisant au relâchement de la paroi.

Cependant, ce modèle d'architecture a depuis été remis en question, notamment par la présence de peu d'interactions supposées entre le xyloglucane et les microfibrilles dans la paroi (Dick-Pérez et al., 2011). Aussi des expériences ont prouvé la croissance pariétale en absence de réseau xyloglucane-cellulose (Peaucelle et al., 2012).

III.4.c Hypothèses du rôle des modifications structurales des pectines

D'autres mécanismes de modification de la paroi semblent donc impliqués dans l'extension et notamment des mécanismes liés à la déméthylation des pectines.

III.4.c.i Influence sur les propriétés mécaniques de la paroi

Plusieurs études ont identifié une corrélation entre la déméthylation des pectines et des changements d'élasticité de la paroi, mesurés par nanoindentation. Par exemple, au niveau de la pointe de tubes polliniques, le degré de méthylation est maintenu élevé grâce à une protéine inhibitrice de PME. Cette zone est 1,5 à 2 fois moins rigide que le reste du tube où la déméthylation des pectines est observée (Zerzour et al., 2009; Wolf et Greiner, 2012; Vogler et al., 2013).

Au contraire, au niveau de méristèmes d'*Arabidopsis thaliana*, une diminution par 2 de la rigidité des parois est mesurée dans les endroits où des pectines déméthylestérifiées ont été localisées par rapport aux parois ne contenant pas de pectines faiblement méthylées (Braybrook et Peaucelle, 2013). Toujours au niveau des méristèmes d'*Arabidopsis thaliana*, le module mesuré sur des plants non transgéniques

est 3 fois supérieur à celui mesuré sur des plants transgéniques, où une PME est surexprimée et les pectines moins méthylées (Peaucelle et al., 2011).

La formation de jonctions calciques supplémentaires peut être à l'origine d'une augmentation de la rigidité lors de la déméthylation. Une diminution de la rigidité peut être quant à elle issue d'une meilleure attractivité des pectines faiblement méthylées pour les PG. La prévalence d'un de ses effets sur l'autre est probablement liée aux conditions biochimiques et physico-chimiques locales de la paroi (Bidhendi et Geitmann, 2016).

III.4.c.ii Lien avec la croissance pariétale

Ces modifications d'élasticité semblent impliquées dans le processus de croissance de la paroi. Mais le lien entre déméthylation et croissance est aussi difficile à comprendre car la déméthylation est parfois liée à une augmentation de la croissance ou à sa réduction (Derbyshire et al., 2007; Levesque-Tremblay et al., 2015; Bidhendi et Geitmann, 2016).

On retrouve par exemple des pectines de faible DM dans des parois à croissance rapide qui nécessitent des parois relâchées (Bosch et Hepler, 2005; Peaucelle et al., 2015; Haas et al., 2020). Un modèle d'élongation de la paroi végétale, incluant la déméthylation des pectines, est proposé par Boyer (2009) pour des cellules d'algue (*Chara corallina*) et considéré par Peaucelle *et al.* (2012) pour les plantes terrestres. Dans ce modèle, un réseau cellulose-pectines assure le support mécanique de la paroi. La formation de pectates par déméthylation de pectines permettrait un relâchement de la paroi par transfert des interactions pectates-calcium des chaînes étirées vers les nouvelles chaînes de pectates déposées et relâchées (Figure 1.28).

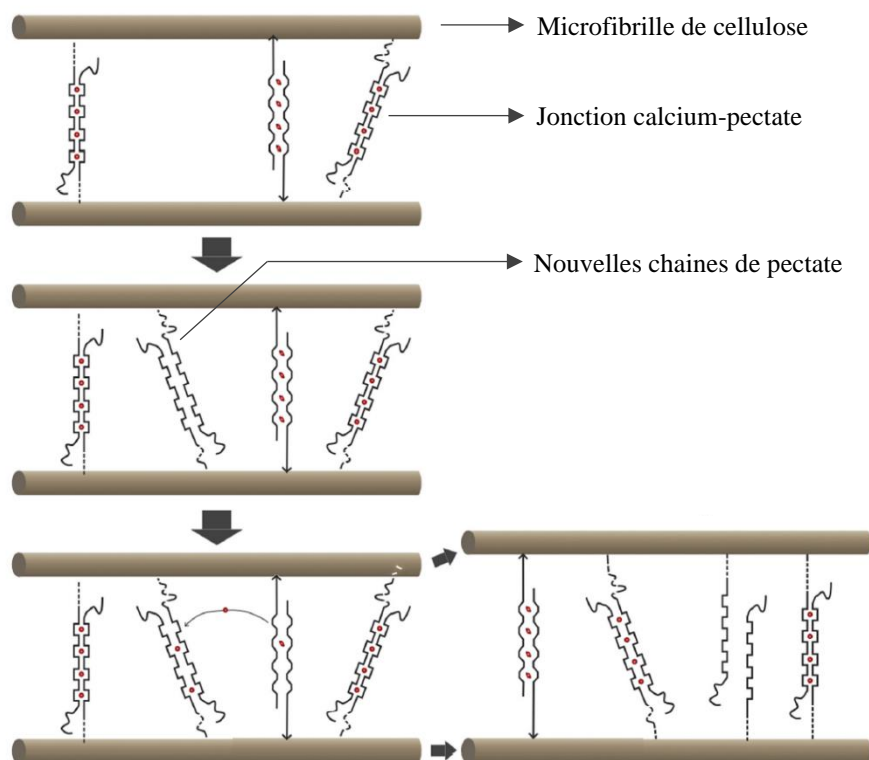


Figure 1.28 : modèle d'extension d'un réseau cellulose-pectines. Les ions calcium (points rouges) sont transférés des jonctions en extensions (jonctions arrondies) vers les nouvelles chaînes de pectate formées par déposition de pectines et déméthylation. Cela conduit à augmenter l'espace entre deux microfibrilles de cellulose. (D'après Boyer, 2009; adapté de Peaucelle et al., 2012).

Dans ce modèle, la nature des interactions entre cellulose et pectines n'est pas précisée. Ce modèle de croissance pourrait être combiné aux autres mécanismes proposés.

III.4.c.iii Boucle de rétroaction

Il est très probable que la déméthylation des pectines fasse partie d'une boucle de rétroaction permettant de contrôler la vitesse d'élongation.

Une diminution de pH peut conduire à la réduction du nombre de jonctions calciques, rendant le réseau plus flexible et plus accessible aux PG et PL. De plus, les enzymes de dépolymérisations et les expansines sont plus actives à pH acide (Willats et al., 2001; Hocq et al., 2017). Les activités des PG et PL sont aussi dépendantes des motifs d'estérification (processif ou aléatoire). Le contrôle de la structure des pectines grâce aux enzymes de remodelage permettrait de réguler finement la vitesse d'allongement. La déméthylation non uniforme de la paroi pourrait aussi être à l'origine de la croissance anisotrope en raison de la présence de zones de rigidité différentes (Peaucelle et al., 2015).

L'élongation de la paroi est donc un phénomène complexe. Plusieurs paramètres biologiques et physico-chimiques sont impliqués dans ces processus qui sont rapides et semblent s'autoréguler. Beaucoup de preuves récentes considèrent les enzymes de remodelage des pectines comme essentielles à ces processus mais les mécanismes exacts restent encore à déterminer. Au cours de la croissance, les propriétés intrinsèques de la paroi sont donc modifiées.

IV. Objectifs

Les parties précédentes ont permis de décrire le contexte global de ce projet et les enjeux actuels. Cette dernière partie s'attache à décrire plus précisément les objectifs auxquels cette thèse souhaite répondre.

IV.1 Reproduction d'une paroi modèle

Une problématique de ce projet est de pouvoir recréer à partir de trois constituants majeurs de la paroi (la cellulose, les hémicelluloses et les pectines) les interactions nécessaires à l'obtention d'un matériau reproduisant le comportement mécanique d'une paroi hydratée.

L'intérêt d'un matériau modèle réside dans sa facilité de manipulation. Or ces trois composants étant des polysaccharides, leur affinité avec l'eau rend difficile leur cohésion dans ce milieu. Au Cermav, l'étude des interactions entre la cellulose et les hémicelluloses a déjà permis de développer des premiers modèles biomimétiques (Jean et al., 2009; Radavidson, 2016; Navon, 2020). Des films puis des capsules biomimétiques ont été réalisés par adsorption couche par couche de xyloglucane sur des cristaux de nanocellulose (CNC). Cependant, l'un des principaux constituants, les pectines, reste à intégrer à ces modèles. Or les pectines semblent être des éléments au rôle majeur dans la morphogenèse de la cellule végétale (Peaucelle et al., 2012) et intéressent particulièrement les recherches en biologie végétale actuelle.

Des modèles mimétiques de la paroi végétale incluant des pectines ont déjà été étudiés comme des films réalisés à partir de cellulose bactérienne en croissance dans une solution de xyloglucane et pectines (Chanliaud et al., 2002). Ils ont observé une différence de croissance de ce réseau cellulosique en présence de pectines et de xyloglucane. Les propriétés mécaniques des films ont été mesurées par tests de traction. Ce modèle montre l'impact de la composition d'un modèle de la paroi végétale sur les propriétés mécaniques. Il s'éloigne cependant de la paroi végétale car la cellulose bactérienne a la particularité de croître en formant un réseau unique et continu, avec de nombreuses connexions, différent du réseau de microfibrilles de la paroi végétale. De plus, sa biosynthèse peut aussi être modifiée en présence d'autres composants. La cristallinité de la cellulose bactérienne est aussi différente de celle des microfibrilles de paroi primaire.

La stratégie adoptée dans cette thèse consiste à former des matériaux par coulage et séchage d'une suspension de microfibrilles de cellulose dans laquelle sont solubilisés les pectines et le xyloglucane. La difficulté réside dans le fait qu'*in vitro*, il n'existe pas d'interaction entre la cellulose et les pectines. Il semble nécessaire de passer par les propriétés de gélification des pectines pour obtenir un matériau auto-supporté à l'état hydraté. Une première étape consiste alors à réhydrater les matériaux et à caractériser leurs propriétés selon le milieu de réhydratation et leur composition. L'influence de nombreux paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la force ionique, la pression osmotique ou encore la composition, sur ces propriétés peut être facilement évaluée avec un tel modèle. Ces résultats sont décrits et discutés dans le chapitre 3.

L'influence de la concentration en calcium et de la force ionique a déjà été évaluée sur des gels mimant la paroi. Des gels de pectines incluant des MFC ont été étudiés par Agoda-Tandjawa *et al.* (2012a, 2012b). Cette étude montre que les propriétés de ces gels sont gouvernées par les propriétés des microfibrilles de cellulose. Cependant ces gels sont très peu denses en polysaccharides contrairement à une paroi végétale. Aussi des gels de pectines ne sont pas auto-supportés et ne peuvent pas être caractérisés par essai de traction. Or cette méthode de caractérisation permet d'être au plus proche des sollicitations subies par la paroi avec la pression de turgescence et des données expérimentales *in planta*. La paroi est en effet principalement contrainte par tension.

Une fois ces premières caractérisations réalisées, il est alors intéressant d'étudier l'effet d'enzymes de remodelage des pectines sur les matériaux.

IV.2 Comportement d'enzymes sur des parois modèles

Le premier objectif de cette thèse est d'obtenir des parois modèles intégrant les pectines et d'établir des relations structure-propriétés. Un deuxième objectif, qui fait l'objet du chapitre 4, consiste à étudier le comportement d'enzymes identifiées comme actrices du remodelage de la paroi, les méthylesterases de pectines (PME) et les polygalacturonases (PG), sur ces modèles.

Il est difficile de comprendre l'activité de ces enzymes sur des substrats végétaux car les plantes s'adaptent facilement à tout changement grâce à la présence de nombreux isoformes de ces protéines d'intérêt. Les enzymes sont alors souvent étudiées sur des substrats solubilisés. Or leurs caractéristiques dépendent certainement de l'environnement dans lequel elles évoluent. Un matériau biomimétique de la paroi permettrait d'étudier le comportement des enzymes de façon plus simple et plus réaliste. Les réactions enzymatiques ayant lieu en milieu aqueux, il est donc essentiel de développer un matériau ayant une tenue mécanique dans cet environnement.

Dans le chapitre 4, les activités enzymatiques sur les matériaux biomimétiques sont comparées aux activités sur des substrats solubilisés. Les évolutions des structures et des propriétés mécaniques des matériaux après réactions enzymatiques sont analysées et comparées aux phénotypes observés sur des végétaux.

Dans les chapitres 3 et 4, on considère principalement le module de traction pour pouvoir comparer les modifications de propriétés mécaniques facilement. Mais ce paramètre n'est pas suffisant pour décrire avec précision le comportement des matériaux biomimétiques. Ces derniers peuvent en effet présenter des caractéristiques plastiques et visqueuse qui ne sont pas retranscrites par le module d'Young.

IV.3 Analyses mécaniques de la relation structure-propriétés d'un modèle de paroi

Les parois végétales ont une résistance mécanique importante face à la pression de turgescence. Comprendre leur comportement mécanique est essentiel pour étudier leur architecture et la morphogenèse. De plus, les parois végétales représentent un intérêt en tant que matériaux dans les secteurs de l'agroalimentaire mais aussi pharmaceutiques et médicaux (Bidhendi et Geitmann, 2019). Dans ces domaines, la connaissance de ses propriétés mécaniques est également essentielle.

Dans le chapitre 5, une paroi modèle constituée de microfibrilles de cellulose et de pectines de faibles degré de méthylestérification est utilisée afin d'évaluer les différents comportements mécaniques et de mieux comprendre les relations entre structure et propriétés de ce matériau. L'objectif est d'identifier quelles sont ses propriétés viscoélastiques et plastiques et de les relier à la composition du matériau.

Plusieurs méthodes de caractérisations des matériaux polymères sont utilisées pour évaluer le comportement du matériau biomimétique en immersion. Des essais de tractions cycliques permettent de quantifier les propriétés viscoélastiques et plastiques tandis que des essais de relaxation de contrainte et de fluage permettent de préciser les temps de relaxation concernés. Les principaux paramètres sont dissociés grâce à des modèles mécaniques appliqués à ces essais et la pertinence des modèles présentés dans cette partie est analysée pour les matériaux biomimétiques.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Dans ce chapitre, une première partie évoque les techniques utilisées pour les caractérisations structurales des pectines. Les résultats de ces caractérisations sont décrits et analysés en deuxième partie. L'étude des interactions entre les microfibrilles de cellulose (MFC) et le xyloglucane (XG) est présentée en partie 3.

Les parties suivantes s'intéressent aux méthodes en rapport avec les films biomimétiques. Premièrement, le protocole de fabrication des films est donné. La partie suivante traite des méthodes employées pour réaliser des réactions enzymatiques sur des pectines en solutions ou incluses dans les films. Et enfin la dernière partie explique les méthodes de caractérisation des matériaux employées pour étudier les propriétés des films biomimétiques.

I. Techniques de caractérisation structurales

Différentes techniques utilisées pour caractériser structurellement les pectines et les matériaux sont détaillées dans cette partie.

I.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

I.1.a RMN ¹H liquide

5 à 10 mg d'échantillons sont solubilisés dans 500 µL d'eau deutérée. Les spectres sont acquis à l'aide d'un spectromètre Avance III à 400 MHz (Bruker, Billerica, États-Unis). Les acquisitions sont réalisées à 353 K. Les paramètres utilisés correspondent à une séquence d'impulsion à 90°, un temps de relaxation D1 de 10 s et un TD de 32 k. 64 scans sont accumulés par acquisitions.

Les déplacements chimiques sont calibrés grâce au pic de l'eau résiduelle à 4,25 ppm.

I.1.b RMN de l'état solide

Les acquisitions sont réalisées sur les échantillons secs avec un spectromètre Bruker Avance III DSX à 400 MHz en utilisant la méthode CP-MAS (cross-polarization and magical angle spinning). Une accumulation d'au moins 3000 scans par échantillon est réalisée à une vitesse de rotation de 12 kHz. Les déplacements chimiques des carbones ¹³C sont calibrés grâce à un spectre de la glycine et au déplacement de son carboxyle (176 ppm). Avec la méthode CP-MAS, les carbones quaternaires sont moins excités donc leur intégration est toujours corrigée par un facteur de réponse. Celui-ci est déterminé grâce à l'intégration du carboxyle de la glycine par rapport à son carbone aliphatique est généralement compris entre 1,03 et 1,1.

Les spectres sont analysés grâce au logiciel MestReNova (MestreLab, Espagne). L'intensité des spectres est calibrée sur le C1 des pectines et/ou de la cellulose selon les échantillons.

I.2 Chromatographies

Ces chromatographies sont réalisées par ou avec l'aide du plateau de chromatographie et d'analyses des sucres (PCANS).

I.2.a Détermination des masses molaires par SEC

La masse molaire des polysaccharides solubles est déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), selon une méthode de routine. Le système est équipé d'une pré-colonne et de deux colonnes SB 806 M HQ ainsi que de détecteurs UV, à indice de réfraction (RI) et à diffusion de lumière (MALS). 100 µL d'échantillon à une concentration de 1 mg/mL sont injectés et élués par une solution de nitrate de sodium à 0,1 mol/L, à un débit de 0,5 mL/min.

I.2.b Chromatographie échangeuse d'anion (HPAEC)

Des techniques de chromatographie peuvent être utilisées pour déterminer la composition osidique de polysaccharides. Une première méthode consiste à hydrolyser les polysaccharides par un acide fort et à quantifier les monosaccharides libérés par chromatographie échangeuse d'ion.

5 à 10 mg d'échantillon sont solubilisés dans 180 μL d'acide sulfurique H_2SO_4 à 72% pendant 45 min à température ambiante. La solution est ensuite diluée pour atteindre une concentration de 1 mol/L d' H_2SO_4 et placée pendant 4h à 110°C. Des dilutions 1/10 et 1/70 sont ensuite réalisées et chaque échantillon est filtré sur 0,2 μm avant injection dans le système d'HPLC.

Les hydrolysats sont analysés par chromatographie ionique sur un système Dionex ICS-6000 (Thermo Fisher, Waltham, États-Unis). Le système est équipé d'une pré-colonne et d'une colonne CarboPAC PA1 (250 x 2 mm) thermostatée à 28°C. 5 μL d'échantillon sont injectés. L'élution est réalisée à un débit de 0,25 mL/min. De 0 à 18 min, une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,018 mol/L est utilisée ; puis, entre 18 et 20 min, un gradient linéaire d'acétate de sodium (NaOAc) de 0 à 0,02 mol/L est ajouté ; et de 20 à 25 min, des gradients linéaires en NaOH de 0,018 mol/L à 0,1 mol/L et en NaOAc de 0,02 mol/L à 0,5 mol/L sont effectués. Les espèces sont détectées par un détecteur à ampérométrie pulsée (PAD).

Les chromatogrammes sont analysés à l'aide du logiciel Chromeleon (Thermo Fisher) et les intégrations et quantifications sont réalisées à l'aide des gammes d'étalonnage préalablement réalisées pour chaque monosaccharide.

I.2.c Méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse

Une deuxième méthode de caractérisation de la composition osidique consiste à méthanolyser les polysaccharides et à quantifier les monosaccharides libérés par chromatographie gazeuse. Cette méthode se base sur les travaux de Kamerling *et al.* (1975) modifiée par Montreuil *et al.* (1986), et permet d'obtenir des monosaccharides de façon plus contrôlée. L'identification et le dosage des monosaccharides nécessitent une hydrolyse par méthanolyse des pectines. Les résidus méthylglycosides sont ensuite triméthylsilylés afin de les rendre volatils. Ils sont ainsi identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse sous forme de méthylglycosides O-triméthylsilylés.

Environ 400 μg d'échantillon lyophilisé et 50 μg de pentaerythritol et 50 μg de myo-inositol (références internes) sont placés dans un bain à sec en présence de 500 μL d'un mélange méthanol/acide chlorhydrique 3 N pendant 4 heures à 110°C. Après refroidissement à température ambiante, le méthanolysat est neutralisé à l'aide de carbonate d'argent, puis 20 μL d'anhydride acétique sont ajoutés afin de réacétyler les osamines présentes. Après une nuit à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 3000 tr/min et le surnageant est évaporé sous jet d'azote. Les composés sont ensuite dissouts dans 70 μL de pyridine et incubés la nuit à température ambiante avec 70 μL de sylon (BSTFA : TMCS, 99 : 1).

Après évaporation douce des réactifs en excès sous jet d'azote, les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris par 650 μL de dichlorométhane puis injectés en chromatographie en phase gazeuse (Système GC-6850 AGILENT, injection in-colonne, détecteur FID : ionisation de flamme). Le gaz vecteur est l'hydrogène. La colonne de type HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diamètre interne) est apolaire. Le programme de montée en température est le suivant : début à 120°C et gradient de 3°C/min jusqu'à 180°C suivi d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 200°C.

Chaque monosaccharide est identifié par comparaison de ses temps de rétention relatifs par rapport à l'étalon interne avec ceux des monosaccharides purs traités dans les mêmes conditions. Un coefficient de réponse est calculé pour chaque monosaccharide par rapport à l'étalon interne afin de définir la proportion de chaque monosaccharide au sein du polysaccharide. Les analyses sont réalisées en triplicat.

L'étalon interne retenu ici est le pentaErythritol en raison d'une meilleure reproductibilité des résultats.

I.2.d Séparation et quantification des oligomères de pectines

Les méthyles des pectines peuvent être distribués de façon aléatoire ou par blocs sur les chaînes pectiques. Plusieurs études se sont intéressées à l'identification de ces motifs structuraux en découpant, par voie enzymatique, des fragments des chaînes homogalacturoniques (Daas et al., 1999; Fraeye et al., 2010b; Ralet et al., 2012; Ström et al., 2007; Tanhatan-Nasseri et al., 2011). Aucune de ces méthodes n'étant entièrement réalisable dans notre laboratoire, une nouvelle méthode de quantification de ces fragments par chromatographie liquide, adaptée de la méthode de Daas (1999), a été développée pour ce projet.

Environ précisément 10 mg de pectines sont dissous dans 2 mL de tampon NaOAc à 50 mmol/L à pH 5,1. L'endo-PG M2 E-PGALUSP (Megazyme, Wicklow, Irlande) est utilisée pour la dégradation. 10 µL d'une solution de PG à 0,08 U/µL sont ajoutés à la solution de pectines.

La préparation est placée à l'étuve pendant 24h à 30°C. L'enzyme est ensuite désactivée par ébullition de l'échantillon pendant 5 min. L'échantillon est centrifugé pendant 10 min à 12000 x g puis filtré sur 20 µm avant d'être injecté dans le système d'HPLC. Des triplicats de chaque type d'échantillon sont réalisés.

Un système HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher) est utilisé pour la séparation des oligomères. Il est équipé d'une colonne C18 Nucleodur Gravity SB (Macherey Nagel, Düren, Allemagne), une colonne phase inverse hydrophobe à sélectivité polaire (4,6 x 250 mm). 10 µL d'échantillon sont injectés à température ambiante. L'éluion est réalisée à un débit de 0,8 mL/min. De 0 à 7 min, une solution aqueuse à 0,05% en acide formique est utilisée puis un gradient linéaire à 30% en acétonitrile et 0,05% en acide formique est effectué entre 7 min et 35 min. Les espèces sont détectées par un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) LC-380 (Varian, Palo Alto, États-Unis). Un flux d'azote à 1,0 slm est imposé et les températures d'évaporation et de nébulisation sont fixées à 80°C et à 40°C respectivement.

Les chromatogrammes sont analysés grâce au logiciel Chromeleon. Les pics d'intérêt sont intégrés selon des gammes étalons allant de 0,02 à 0,8 g/L de standard d'acide galacturonique (AGal) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) et allant de 0,1 à 1,0 g/L de standards d'acide digalacturonique (diAGal) et d'acide trigalacturonique (triAGal) (Megazyme). La pureté des standards est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 2.1 : puretés des oligomères d'acides galacturoniques données par les fournisseurs.

Standard	Pureté
AGal, H ₂ O (Sigma Aldrich)	98%
DiAGal (Megazyme)	97%
TriAGal (Megazyme)	92%

II. Caractérisation des pectines

Les pectines sont des polymères complexes. Les sources et les conditions d'extraction amènent à des polymères de structures variées. Quatre échantillons fournis commercialement (P35, P52, P61 et P71) et un échantillon déméthylé au laboratoire à partir des pectines P35 sont analysés.

II.1 Préparation des pectines

Les pectines ont été extraites de peau d'agrumes. Deux grades sont principalement utilisés et nommés selon leur degré de méthylestérification (DM) : P52 (P9135, Sigma Aldrich) et P35 (Cargill, Malchin, Allemagne). Deux autres grades, P61 et P71 (Cargill), ont été parfois utilisés.

Ces pectines sont purifiées pour éliminer d'éventuelles traces d'ions calcium ou magnésium. 5 à 10 g de pectines sont solubilisés à 1% dans l'eau distillée. Une solution d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (0,5 mol/L, pH 8) est ajoutée une fois les pectines solubilisées. Le volume est adapté pour avoir une concentration d'EDTA d'au moins 0,035 mol/L dans la solution de pectines. Le pH de la solution de pectines est ajusté à 8 avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 mol/L. Elle est ensuite

dialysée, avec une membrane de seuil de rétention de 14000 Da, contre l'eau distillée pendant 10 jours jusqu'à atteindre une conductivité faible et stable. La solution est filtrée sur filtre de nitrate de cellulose de porosité 5 µm avant d'être lyophilisée.

Des pectines de DM 0% (P0) sont obtenues à partir de P35 par hydrolyse des esters en milieu basique. Les pectines sont dissoutes à 0.6% dans de l'eau distillée et le pH est amené à 12 avec une solution de NaOH à 8 mol/L. L'agitation est maintenue 30 min puis la solution est neutralisée à l'aide d'acide chlorhydrique. La solution est dialysée pendant 5 jours puis lyophilisée.

II.2 Degré de méthylestérification

Un des paramètres majeurs à prendre en compte lorsqu'on s'intéresse aux propriétés des pectines est le degré de méthylestérification (DM). L'acide galacturonique est présent à la fois sous la forme acide et sous la forme méthylestérifiée (Figure 2.1).

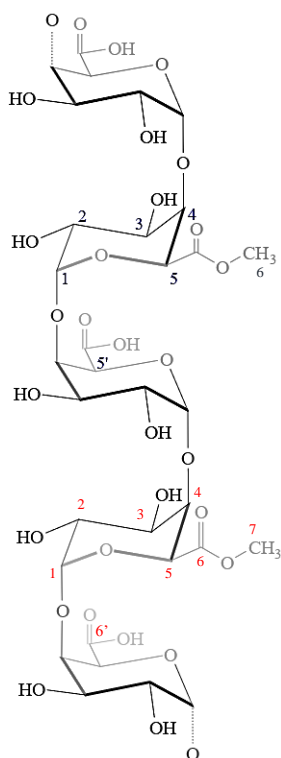


Figure 2.1 : structure schématique d'une chaîne d'homogalacturonane contenant des acides galacturoniques méthylés ou non. Les atomes d'hydrogènes observés en RMN du proton sont labellisés en noir. Les atomes de carbone observés en RMN de l'état solide sont labellisés en rouge.

II.2.a RMN ¹H

Le DM est mesuré par RMN du proton sur les pectines solubilisées. Les échantillons sont caractérisés après purification à l'EDTA.

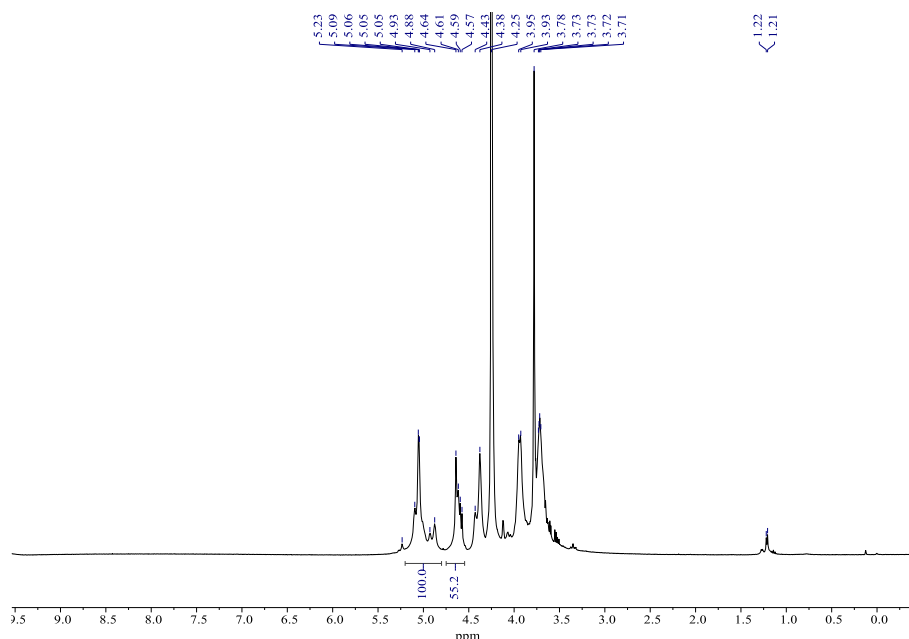


Figure 2.2 : spectre RMN ¹H de l'échantillon P35.

Les pics sont attribués et les DM calculés grâce aux travaux de Grasdalen *et al.* (1988) et Rosenbohm *et al.* (2003).

Tableau 2.2 : attribution des déplacements chimiques aux hydrogènes des pectines.

Label hydrogène	Déplacement chimique (ppm)
Méthyle du rhamnose ¹	1,2
2	3,7
6	3,8
3	3,9 – 4,0
DOH	4,25
4	4,4 – 4,5
5'	4,6 – 4,8
5	4,8 – 5,0
1	5,0 – 5,1

Les pics d'intérêts pour le calcul du DM se trouvent entre 4,5 et 5,3 ppm (Figure 2.3) et l'intégration des zones A et B permettent de le calculer à l'aide de l'équation [2.1].

$$DM = 100 * \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \quad [2.1]$$

¹ Attribué selon An *et al.* (1994) et Vidal *et al.* (2000)

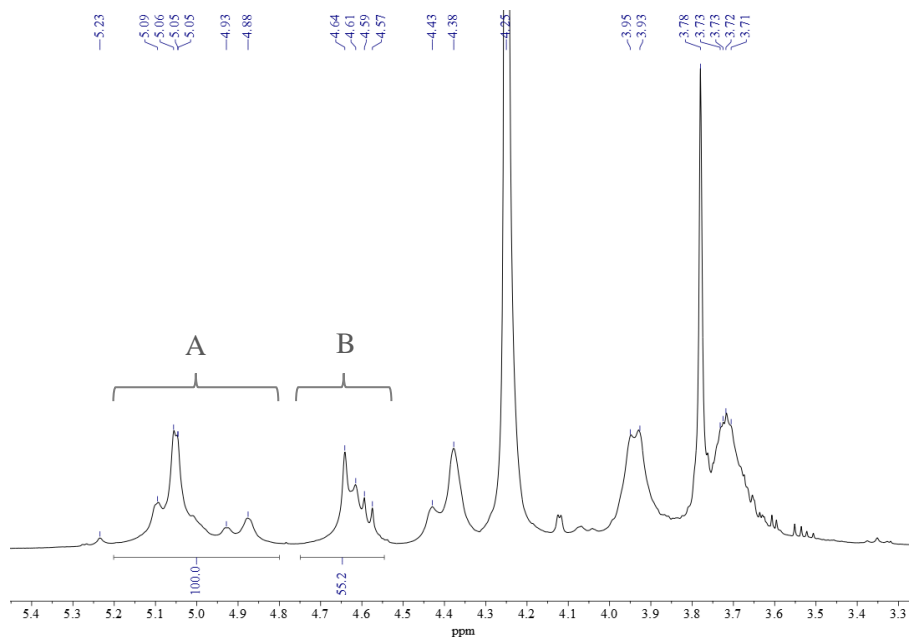


Figure 2.3 : zoom du spectre précédent et identification des intégrales de calcul du DM.

Pour les échantillons dont le DM est donné par le fournisseur, on observe que les degrés de méthylation mesurés sont assez proches de celui donné mais tous inférieurs (Tableau 2.3). L'intensité des pics observés dépend de la mobilité des molécules dans le solvant. Il est nécessaire de comparer cette mesure avec une autre méthode.

Tableau 2.3 : valeurs de DM obtenues par RMN ¹H.

Pectines	P0	P35	P52	P61	P71
DM (%)	0,2	28,8	53,9	58,3	54,8
DM (%) fournisseurs	/	35	/	61	71

La déméthylation du P35 semble bien conduire à un polymère complètement déméthylé.

II.2.b RMN de l'état solide

On peut analyser des échantillons à l'état solide grâce à la méthode de RMN CP-MAS. Cette méthode sera utilisée pour caractériser les matériaux biomimétiques, il est donc pertinent de l'utiliser également pour déterminer les DM des pectines seules et les comparer à ceux obtenus pour les matériaux. Les pics sont attribués d'après les travaux de Sinitsya *et al.* (1998) et Zhu *et al.* (2014) (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : attribution des déplacements chimiques de la RMN CP-MAS aux carbones des pectines.

Label carbone	Déplacement chimique (ppm)
Méthyle du rhamnose	17,5 – 18
7	53,5
2, 3 et 5	68 – 71
4	79
1	101
6	171
6'	175

Les pectines utilisées pour cette caractérisation sont à pH 6, pH supérieur au pKa des pectines (3,5 – 4,5). Les acides carboxyliques sont donc sous la forme déprotonnée et sont attribués au pic à 175 ppm (Figure 2.4). On peut aussi noter que les pectines ne sont pas acétylées car un signal apparaîtrait à 20 ppm.

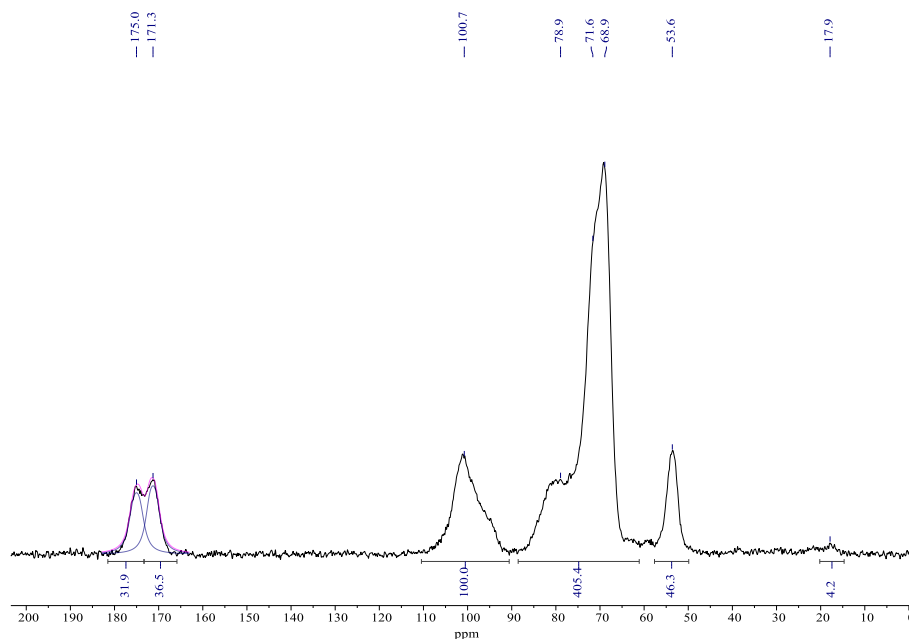


Figure 2.4 : spectre RMN CP-MAS de l'échantillon P52. Facteur de correction des carbones quaternaires : 1,08.

Le degré de méthylation est déterminé de deux manières différentes (Figure 2.5). La première consiste à faire le rapport de l'intégration du pic du carbone des méthyls des esters (53 ppm)² sur la somme des intégrations des pics du carbone des acides carboxyliques et des esters (171-175 ppm)³. La deuxième méthode consiste à faire le rapport de l'intégration du pic du carbone des esters (171 ppm), après déconvolution, sur la somme des intégrations des pics du carbone des acides carboxyliques et des esters (171-175 ppm).

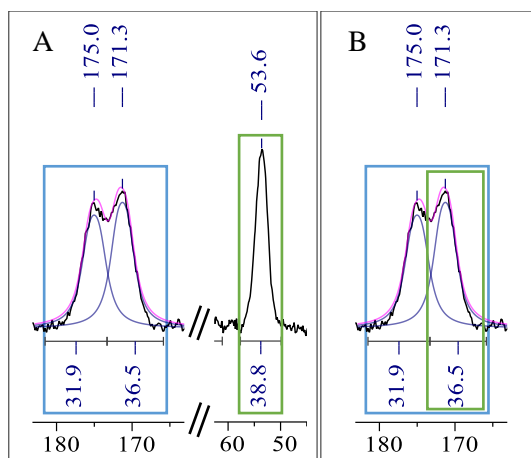


Figure 2.5 : zoom du spectre précédent sur les zones intégrées pour le calcul du DM.

$$A \quad \%DM = \frac{\text{vert}}{1,08 * \text{bleu}} \quad [2.2]$$

$$B \quad \%DM = \frac{\text{vert}}{\text{bleu}} \quad [2.3]$$

Les valeurs reportées sont les moyennes et écart-types de ces calculs (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 : valeurs de DM obtenues par RMN CP-MAS.

Pectines	P0	P35	P52	P61	P71
DM (%)	1,6	31,1	52,5	61,5	65,8
Écart-type	2,3	5,7	0,8	1,2	1,5

Pour les P0 et les P35, la méthode de comparaison des deux pics carboxyles est moins précise et mène donc à des plus grandes incertitudes. Avec cette méthode, on identifie quelques méthyls résiduels sur

² Ligne de base de ce pic corrigée

³ Corrigée du facteur de réponse des carbones quaternaires

les P0. Pour les échantillons dont le DM est donné par le fournisseur (Tableau 2.3), on remarque que par analyse RMN de l'état solide, les valeurs de DM mesurées sont plus proches des valeurs données.

À l'état solubilisé, les pectines peuvent former des agrégats moins mobiles que des molécules complètement solubilisées. Cela peut être responsable d'une erreur de mesure en RMN du proton des solutions de pectines. On peut supposer que les agrégats formés en solution contiennent plutôt des fractions fortement méthylées car le DM mesuré en RMN ¹H est inférieur à celui mesuré en RMN de l'état solide. La RMN de l'état solide semble donc plus appropriée pour caractériser ces polysaccharides. Ces valeurs seront conservées comme référence pour la suite du manuscrit.

II.3 Distribution des motifs d'estérification

La distribution des motifs d'estérification est déterminée grâce à la méthode développée en s'adaptant de l'étude de Dass *et al.* (1999).

Les blocs non-estérifiés, c'est-à-dire les zones contenant un enchainement d'au moins 4 acides galacturoniques, sont spécifiquement dégradées par une endo-polygalacturonase (endo-PG). Les oligosaccharides sont ensuite séparés par HPLC à pH acide et détectés par un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). La quantification des monomères, dimères et trimères d'acides galacturoniques et le ratio de ces composants par rapport à la quantité initiale en pectines permet de déterminer un DB.

On différencie le DB qui est le ratio des monomères (AGal), dimères (DiAGal) et trimères (TriAGal) d'acides galacturoniques par rapport au total d'acides galacturoniques présents dans les pectines initialement ; et le DB absolu (DB_{abs}) qui lui considère la quantité des AGal, DiAGal et TriAGal par rapport à la quantité totale de pectines (incluant acides galacturoniques et galacturonanes méthylestérifiés).

$$DB = \frac{[AGal] + [DiAGal] + [TriAGal]}{[acides\ galacturoniques]} \quad [2.4]$$

$$DB_{abs} = \frac{[AGal] + [DiAGal] + [TriAGal]}{[pectines]} \quad [2.5]$$

Les résultats de cette caractérisation sont détaillés dans le chapitre 4.

II.4 Composition osidique

Les pectines sont majoritairement composées de groupes homogalacturoniques (HG) mais des parties peuvent être constituées de groupes rhamnogalacturoniques (RG I et RG II) et xylogalacturoniques (XGal) (Harholt *et al.*, 2010). Ces groupes sont composés d'acides galacturoniques (méthylestérifiés ou non) et d'autres sucres caractéristiques. Leurs structures sont rappelées dans le tableau suivant.

Tableau 2.6 : structure des sucres identifiés dans les pectines des parois primaires de dicotylédones.

Sucre	Acide Galacturonique	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Xylose
Structure					
Groupe	Squelette principal	RG I / RG II	RG I / RG II	RG I / RG II	XGal

Les groupements RG II sont très complexes et peuvent être constitués d'une variété de sucres, en plus de ceux mentionnés dans le tableau, tels que le fucose, l'apiose, l'acide acérique ou l'acide glucuronique.

L'étude de la composition osidique des échantillons permet d'évaluer les proportions de chaque groupe.

II.4.a Chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC)

Cette méthode consiste à hydrolyser les pectines et identifier et quantifier les monosaccharides libérés par chromatographie ionique. En plus de l'acide galacturonique (AGal), elle permet de quantifier le rhamnose, le fucose, l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannose, le xylose et l'acide glucuronique avec une limite de quantification de 2.10^{-4} g/L.

Le rôle de la purification par l'EDTA est d'abord vérifié en comparant un échantillon de pectines P52 avant et après purification (Figure 2.6).

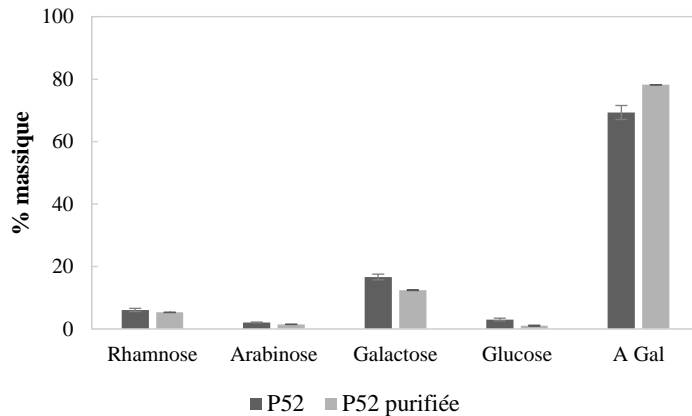


Figure 2.6 : pourcentages des monosaccharides détectés dans un échantillon de P52 avant et après purification.

Lorsqu'on compare les analyses des échantillons commerciaux non modifiés et celles des échantillons traités à l'EDTA et dialysés, on remarque une augmentation du taux d'acides galacturoniques (% AGal) et une diminution des proportions des autres sucres. Cela suggère que les groupes rhamnogalacturoniques (et éventuellement xylogalacturoniques) sont plutôt présents dans des chaînes pectiques de faibles masses molaires. Cette étape permet donc une purification des substrats et seuls les échantillons purifiés sont présentés dans la suite de ce paragraphe.

Les compositions osidiques des différents lots de pectines sont ensuite comparées (Figure 2.8).

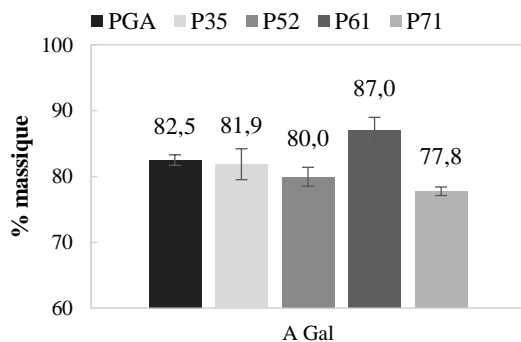


Figure 2.7 : pourcentages d'acides galacturoniques dans les différents échantillons de pectines

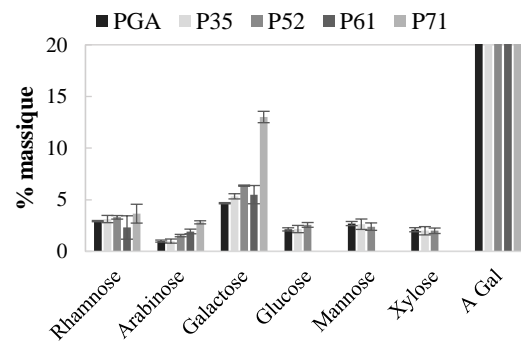


Figure 2.8 : pourcentages de l'ensemble des monosaccharides dans les différents échantillons de pectines

Avec cette méthode de quantification, les pourcentages d'unité galacturoniques sont d'environ 80%, sauf pour les pectines P61 (87%). Ces pourcentages sont cohérents avec ce qui est généralement reporté pour des pectines d'agrumes (Zhan et al., 1998).

Les autres sucres majoritairement présents dans tous les échantillons sont le rhamnose, l'arabinose et le galactose. Ces trois sucres peuvent être issus de groupements rhamnogalacturoniques. La présence de galactose et arabinose en proportion équivalente voire supérieure au rhamnose ainsi que l'absence de sucres spécifiques des RG II suggèrent des groupes RG I plutôt que des RG II. Le plus fort pourcentage en galactose laisse penser que ce sont des zones courtes fortement ramifiées en galactoses.

Le xylose peut être issu de groupes xylogalacturoniques mais les faibles pourcentages en glucose et mannose dans certains échantillons laissent plutôt penser que des résidus cellulosiques et/ou hémicellulosiques, comme le xyloglucane, sont restés en interaction avec les pectines lors de leur extraction.

II.4.b Chromatographie en phase gazeuse

L'hydrolyse des pectines à l'acide sulfurique peut conduire à la formation de produits de dégradation non identifiables en chromatographie ionique. Ces produits conduisent à sous-estimer le pourcentage d'acides galacturoniques (Francillon, 2021).

Une autre méthode d'analyse, la méthanolyse des polysaccharides et l'analyse des monosaccharides libérés par chromatographie gazeuse a été réalisée sur deux échantillons de pectines purifiées, P35 et P52. L'ensemble des sucres identifiables par chromatographie HPAEC peuvent être quantifiés par cette méthode.

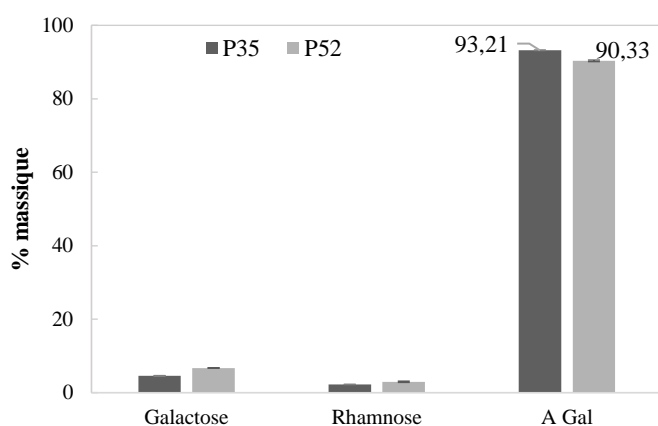


Figure 2.9 : pourcentages des monosaccharides identifiés après méthanolyse des échantillons P35 et P52

Avec cette méthode d'hydrolyse, 71% pour P35 et 76.5% pour P52 des masses initiales sont hydrolysées en sucres identifiables. Les échantillons sont des aérogels qui ont un fort pouvoir hygroscopique et, en général, 10% de la masse de l'échantillon correspond à de l'eau. L'analyse du taux de cendres de ses échantillons permet aussi d'identifier environ 10% de matières minérales. Il reste donc environ 10% de la masse initiale qui n'est pas analysée.

Dans ces 2 échantillons, l'acide galacturonique est quantifié à environ 90% des sucres présents. Ces proportions sont largement supérieures à celles identifiées par la méthode précédente (82% pour P35, 80% pour P52). Elles peuvent s'expliquer par la diminution de la formation de produits de dégradation lors de la méthanolyse, comparé à l'hydrolyse à l'acide sulfurique. Il est intéressant de noter que l'arabinose, le glucose, le mannose et le xylose ne sont pas présents. Leur absence contribue aussi à l'augmentation des ratios des autres sucres. Soit leurs quantités sont sous la limite de détection de cette méthode soit ces espèces sont moins réactives lors des étapes de méthanolyse et de triméthylsilylation.

Les autres sucres présents sont le galactose et le rhamnose et sont quantifiés en proportions légèrement inférieures à celles obtenues par la chromatographie ionique.

Les deux méthodes de chromatographie permettent d'identifier l'homogalacturonane comme étant largement majoritaire. Les échantillons semblent ensuite être constitués de quelques pourcents de groupement RG I. L'analyse HPAEC met aussi en avant la complexité des pectines en détectant plusieurs espèces osidiques.

Cependant, ces méthodes nécessitent de passer par des étapes de transformation afin d'obtenir les monosaccharides analysables. Les monosaccharides que l'on souhaite quantifier ont des structures variées et n'ont donc sans doute pas le même degré de réactivité face à ces étapes. On peut alors être amené à sous-estimer certains ratios alors que certains sucres seront sur-représentés.

II.4.c RMN de l'état solide

En RMN de l'état solide, l'échantillon n'est pas transformé avant sa caractérisation. On analyse donc la structure complète des pectines.

D'après les résultats de chromatographie précédent, parmi les sucres identifiés dans la structure de nos échantillons de pectines, seuls les galacturoniques possèdent des carboxyles. Le rapport de l'intégration de ces pics (171 ppm et 175 ppm)⁴ avec celle de la région correspondant aux C₁ des sucres (95 ppm et 101 ppm) permet d'estimer un pourcentage molaire d'unités galacturoniques (Figure 2.10).

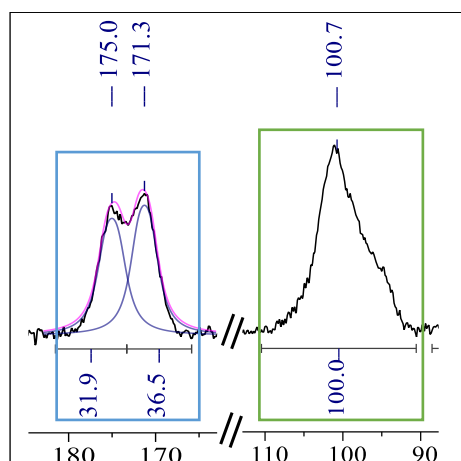


Figure 2.10 : zooms du spectre RMN CP-MAS de l'échantillon P52.

$$\%AGal = 100 * \frac{1,08 * \text{bleu}}{\text{vert}} \quad [2.6]$$

Tableau 2.7 : résultats des pourcentages d'acides galacturoniques obtenus par RMN CP-MAS.

Pectines	P0	P35	P52	P61	P71
AGal (%)	78,6	75,9	73,9	83,3	73,7

Tous les échantillons semblent constitués d'environ 75% d'acides galacturoniques (Tableau 2.7). Les pectines P61 ont un pourcentage plus élevé à 83%. On peut encore une fois noter que l'étape de déméthylation des P35 en P0 a un effet sur la structure des pectines.

Les pourcentages d'acides galacturoniques obtenus avec cette technique sont inférieurs à ceux obtenus précédemment. Il semblerait que les techniques de chromatographies surestiment le taux d'acides galacturoniques.

Cependant, avec la RMN, les autres sucres supposés présents dans la structure des pectines ne sont pas identifiables. Les déplacements chimiques de leurs carbones sont généralement confondus avec ceux des pectines. Seul le carbone du groupement méthyle caractéristique du rhamnose est facilement identifiable à 17,5 ppm (Sinitsya *et al.*, 1998) (Figure 2.4) mais il est difficile à intégrer précisément, suggérant de très faible taux en rhamnose, inférieurs à 5%. Ce résultat est cohérent avec les taux de rhamnose identifiés par chromatographies.

Les spectres RMN permettent aussi de vérifier qu'aucun acide galacturonique n'est sous forme acétylé car le méthyle de ce groupe apparaîtrait à 21 ppm sinon (Renard et Jarvis, 1999).

En conclusion, les caractérisations des compositions osidiques des pectines montrent que celles utilisées dans ce projet sont des pectines principalement composées d'HG et peu branchées.

⁴ Intégration corrigée par le facteur de réponse des carbones quaternaires (généralement entre 1,03 et 1,1).

II.5 Masses molaires

Les masses molaires moyennes sont déterminées par SEC (Tableau 2.8). Le degré de polymérisation est calculé par le rapport de la masse molaire moyenne en nombre et de la masse molaire d'une unité galacturonane. Cette dernière est estimée en tenant compte du degré de méthylation (DM) des pectines (Tableau 2.5).

$$M_0 = DM * 208 + (1 - DM) * 194 \quad [2.7]$$

Tableau 2.8 : masses molaires moyennes, indice de polydispersité et degré de polymérisation moyen des échantillons de pectines.

Pectines	P0	P35	P52	P61	P71
M_w (kDa)	102,4 ± 5,8	115,6 ± 2,1	179,1 ± 11,4	149,3 ± 1,7	142,0 ± 0,2
M_n (kDa)	55,1 ± 6,1	38,0 ± 1,1	89,2 ± 8,8	73,8 ± 1,0	43,4 ± 0,5
I_p	1,90 ± 0,10	3,05 ± 0,03	2,00 ± 0,10	2,02 ± 0,01	3,28 ± 0,02
DP_n	284	192	443	364	214

Les différents échantillons fournissent une variété de masses molaires. Les pectines P35 sont celles de masses et de degré de polymérisation les plus faibles tandis que les pectines P52 possèdent les valeurs les plus élevées. Avec des masses molaires de cet ordre de grandeur, on peut supposer la présence d'enchevêtrements dans des milieux concentrés en pectines.

Tous les échantillons sont polydispersés mais on peut noter que la déméthylation des P35 en P0 conduit à une réduction de la dispersité.

III. Fabrication des matériaux

III.1 Caractéristiques et préparation des composants initiaux

III.1.a Microfibrilles de cellulose

La suspension de MFC est issue du Centre Technique du Papier (CTP) (Grenoble, France). La microfibrillation est réalisée par homogénéisation de pulpe de cellulose.

Pour cette suspension de MFC, la pulpe de cellulose a été obtenue à partir de fibres de bouleau traitées par un procédé de type kraft, permettant d'extraire la lignine et une majorité d'hémicelluloses. 16% d'hémicelluloses, principalement des xylanes adsorbés sur la cellulose, sont toujours présents dans la pulpe (Falcoz, 2016).

Pour obtenir de la cellulose microfibrillée, c'est-à-dire une suspension contenant des microfibrilles de cellulose de diamètre inférieur à 100 nm, un traitement mécanique à forte pression et à température élevée a été réalisé sur la pulpe (homogénéisation). La suspension qui en résulte contient aussi d'autres résidus cellulosiques de tailles variées (Falcoz, 2016).

Un séchage de quelques grammes de suspension de MFC à 60°C pendant au moins 24h est réalisé afin de déterminer le taux de masse sèche. Celui-ci est de 3,3% ± 0,2%.

III.1.b Pectines

Les pectines ont été extraites de peau d'agrumes. Deux grades sont principalement utilisés et nommés selon leur DM : P52 (P9135, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) et P35 (Cargill, Malchin, Allemagne). Deux autres grades, P61 et P71 (Cargill), ont été parfois utilisés. L'acide polygalacturonique est obtenue à partir de P35 par hydrolyse des esters en milieu basique.

Ces pectines sont purifiées pour éliminer d'éventuelles traces d'ions calcium ou magnésium.

III.1.c XG

Le xyloglucane a été extrait de graines de tamarinier (Dainippon Pharmaceutical Co, Osaka, Japon) et a été purifié selon le protocole décrit par Muller *et al.* (2011). Sa masse molaire moyenne en nombre est d'environ 500 kDa (Navon, 2020).

Le xyloglucane purifié est dissout à 1% dans l'eau distillée puis la solution est lyophilisée afin d'obtenir un aérogel facile à solubiliser. Il est conservé dans les conditions atmosphériques.

III.1.d Solution de calcium

Une solution de calcium est préparée à partir de CaCl_2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne). Sa concentration est ajustée selon le DM des pectines et le ratio R souhaité. R est défini par :

$$R = 2 * \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[-\text{COO}^-]} \quad [2.8]$$

III.2 Protocole

Les matériaux biomimétiques sont réalisés par assemblage des éléments principaux d'une paroi primaire végétale : la cellulose, sous forme d'une suspension de MFC ; les pectines et le xyloglucane, sous forme d'aérogels. Ces derniers sont solubilisés dans la suspension de MFC, en présence de calcium, et ce mélange est ensuite coulé et séché afin d'obtenir un film manipulable.

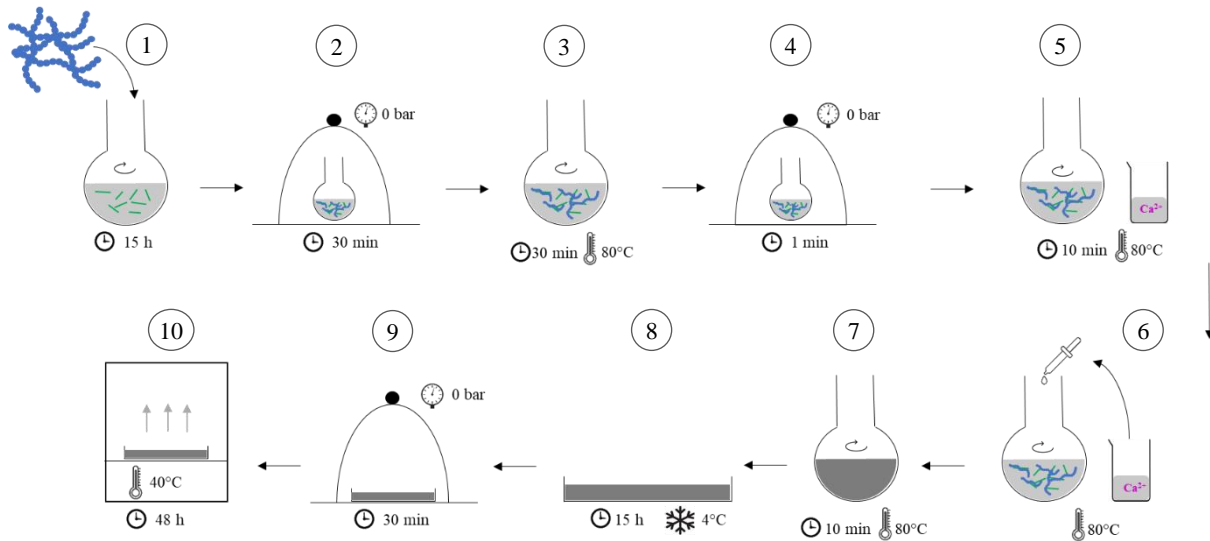


Figure 2.11 : schéma des étapes de fabrication des films (vert = MFC ; bleu = pectines ou pectines + xyloglucane).

La viscosité de la suspension doit être suffisamment fluide pour pouvoir la couler dans un moule mais également visqueuse afin d'éviter la sédimentation des MFC lors des premières heures de séchage. Une concentration massique, avant coulage, d'environ 2,5% en polysaccharides permet d'atteindre ces caractéristiques.

Le mélange des aérogels avec la suspension de MFC est d'abord dilué à une concentration massique de 3,3% en polysaccharides et agité dans un ballon, à température ambiante, pendant minimum 15h afin de complètement solubiliser les aérogels (1). Typiquement, un mélange d'environ 30 g est obtenu à cette étape.

La dissolution des aérogels mène à l'incorporation d'air dans la suspension. Pour éviter la présence de bulles dans le film sec, plusieurs étapes de dégazage sont nécessaires. Une cloche à vide, reliée à une pompe à membrane, est utilisée. Un premier dégazage de 30 min est réalisé avant l'étape suivante (2).

Celle-ci consiste à ajouter une solution de calcium de concentration adaptée au ratio R souhaité et de volume permettant d'atteindre la concentration massique finale de 2,5% en polysaccharides. Typiquement, 10 mL d'une solution de calcium sont ajoutés aux 30 g du mélange de polysaccharides. Pour éviter la formation d'agrégats gélifiés, il est nécessaire de chauffer le milieu à 80°C (Agoda-Tandjawa et al., 2012a).

Le mélange de polysaccharides est homogénéisé pendant 30 min à 80°C (3). Un dégazage d'environ 1 min est ensuite réalisé afin d'éliminer l'air tout en limitant la vaporisation de l'eau (4). Puis, la solution de calcium, préalablement chauffée à 80°C (5), est ajoutée goutte à goutte dans le mélange (6). La suspension est laissée sous agitation à 80°C pendant 10 à 30 min supplémentaire (7).

Environ 40 g de suspension sont ensuite coulés dans un pétri en polystyrène de diamètre 9 cm. La gélification complète des pectines avec le calcium prend plusieurs heures (Cardoso et al., 2003), la boîte de pétri est donc placée au moins 15h à 4°C (8). Un dégazage de 30 min du gel est ensuite réalisé (9) puis la boîte de pétri, ouverte, est placée dans une étuve, non ventilée, à 40°C pendant 48h (10). Ces conditions de séchage permettent d'obtenir un film d'environ 1 g, sans fissure, d'épaisseur homogène d'environ 120 µm.



Figure 2.12 : photo d'un film sec.

Les films sont conservés dans les conditions atmosphériques avant utilisation.

IV. Réactions enzymatiques

IV.1 Réactifs

IV.1.a Enzymes

Une pectine-méthylestérase (PME) d'origine fongique, Novoshape (Novozymes, Bagsværd, Danemark), est principalement utilisée. Elle est issue d'*Aspergillus aculeatus* et ne contient pas de polygalacturonases. Elle est active entre 10°C et 60°C à un pH optimum de 4,8. La solution est conservée à 4°C. Un dessalage sur Sephadex G-25M en milieu tampon MOPS (acide 4-Morpholinopropanesulphonique) à 0,1 mol/L et à pH 6 est réalisé et une migration sur gel SDS-PAGE (SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet d'estimer une concentration à environ 1 µg/µL en protéines.

Une pectine-méthylestérase issue d'écorce d'orange est achetée chez Sigma Aldrich (P5400). Elle est conservée sous forme de poudre à 4°C. Une solution à 4 µg/µL en protéine est préparée dans du tampon MOPS à 20 mmol/L et à pH 6 avant utilisation.

Une endo-polygalacturonase (endo-PG), M2 E-PGALUSP, est achetée chez Megazyme. Elle est issue d'*aspergillus aculeatus* et est conservée dans une solution de sulfate d'ammonium à 3,2 mol/L, à 4°C. La protéine a une masse moléculaire de 42000 g/mol. Son activité optimale est obtenue à 50°C et à pH 5,5. Une migration sur gel SDS-PAGE est réalisée et permet de confirmer sa pureté. Sa concentration est estimée entre 3 et 6 µg/µL.

Des PME et PG fournies par l'équipe BIOPI (Biologie des plantes et innovation) de l'Université Picardie Jules Verne (UPJV) sont utilisées. Les protéines sont produites par expression en milieu hétérologue (*pichia pastoris*).

IV.1.b Autres réactifs

IV.1.b.i MOPS (acide 4-Morpholinopropanesulphonique)

Un milieu tampon MOPS (Carl Roth) est utilisé pour contrôler le pH des solutions. Le réactif provient de Selon les conditions, la concentration en MOPS est ajustée entre 20 et 100 mmol/L, et le pH entre 6 et 8. Le pH est ajusté à l'aide du solution NaOH à 1 mol/L. Les solutions MOPS sont conservées à l'abri de la lumière et à 4°C.

IV.1.b.ii MBTH (N-methylbenzothiazolinone-2-hydrzone)

Le MBTH est issue de Sigma Aldrich. Une solution à 3 mg/mL est préparée dans l'eau distillée.

IV.1.b.iii Solution ferrique

Une solution de sulfate d'ammonium ferrique $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ (Sigma Aldrich) à 5 mg/mL est préparée en présence de 5 mg/mL d'acide sulfamique (H_3NSO_3) (Fluka).

IV.1.b.iv Alcool oxydase

Une solution commerciale d'alcool oxydase (Sigma Aldrich) issue de *Pichia pastoris* est utilisée. Une dilution à 0,1 U/ μL est réalisée dans le tampon MOPS avant utilisation.

IV.2 Réactions en solution homogène

Les PME sont ajoutées dans des solutions de pectines en milieu tamponné et l'activité enzymatique est quantifiée selon le protocole d'Anthon et Barrett (2004). Ce protocole consiste à doser le méthanol libéré par la réaction. Pour cela, le méthanol est oxydé par l'alcool oxydase en présence de MBTH. Le produit de cette réaction forme un complexe bleu (bleu formazan) en milieu acide et en présence de fer (III), détectable par absorbance UV à 620 nm à l'aide d'un spectromètre UV Cary 50 (Varian).

Le milieu réactionnel est constitué de 50 μL d'une solution de pectines à 8 mg/mL, 200 μL de MBTH à 3 mg/mL, 25 μL d'AO à 0,1 U/ μL , d'un volume de PME allant de 0,5 à 10 μL et du volume de milieu tampon MOPS à 100 mmol/L et à pH 6 permettant de compléter le milieu réactionnel à 1 mL. La réaction est réalisée à 30°C et sa cinétique est suivie en effectuant des prélèvements de 100 μL du milieu réactionnel. Chaque prélèvement est mis en présence de 100 μL de la solution ferrique. Cette réaction de complexation est réalisée pendant 30 min à température ambiante et permet de stopper la réaction enzymatique. 800 μL d'eau sont ensuite ajoutés pour stopper la réaction de complexation et l'absorbance UV de ce dernier milieu est mesurée à 620 nm dans une cuve de 1 cm. La détermination de la concentration en méthanol est réalisée grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 5 $\mu\text{mol/L}$ de méthanol en présence de P35 à 8 mg/mL.

IV.3 Réactions sur matériaux

IV.3.a Échantillonnage

Les films de polysaccharides sont placés dans une cloche humide contenant un bain d'eau pendant au moins 2h afin d'être assouplis pour éviter la création de fissures lors de la découpe des échantillons. Des bandes de dimensions 40 x 5 mm sont découpés dans le centre du film puis sont séchées pendant au moins 2h à 60°C avant utilisation.

Il est intéressant de connaître la quantité de calcium présente dans chaque bande avant immersion pour pouvoir la comparer au réservoir de calcium de la solution d'immersion. Selon le DM des pectines et le ratio R en calcium ajouté à la fabrication, les échantillons ne contiennent pas tous initialement la même quantité en calcium. Quelques exemples d'échantillons souvent utilisés, composés de 30% de MFC et de 70% de pectines, sont donnés dans le Tableau 2.9.

Tableau 2.9 : quantité de calcium présent dans les films selon le DM des pectines et le R visé.

Pectines	R	n(Ca ²⁺) (.10 ⁻⁵ mol)
P35	0,25	0,7
	0,5	1,4
P52	0,25	0,5
	0,5	0,9

La quantité de calcium par échantillon est d'en moyenne 1.10^{-5} mol.

IV.3.b Conditions expérimentales

Les réactions sur les matériaux biomimétiques sont réalisées dans un milieu tampon MOPS à 50 mmol/L. Du chlorure de calcium CaCl₂ (Carl Roth) est ajouté au milieu.

Chaque échantillon de dimensions 40x5 mm est préalablement pesé sec. Il est ensuite immergé dans le milieu tampon pendant une nuit avant d'ajouter l'enzyme. La réaction est réalisée à 30°C sans agitation.

De façon générale, si ce n'est pas précisé autrement, le volume de solution est de 0,6 mL, la concentration en CaCl₂ est de 0,1 mol/L, le pH du milieu est de 6, la pression osmotique est de 0 MPa, la concentration en enzyme PME Novoshape est de 0,5 µL/mL et la durée de réaction est de 2h.

Le pH peut être modifié à 8 en utilisant le même milieu tampon ou à 5 en utilisant un milieu tampon acétate de sodium (NaOAc) à 50 mmol/L. La pression osmotique peut être contrôlée par ajout de polyéthylène glycol (PEG) (Sigma Aldrich) de masse molaire moyenne en masse de 20000 g/mol. La relation entre la pression osmotique et la concentration massique en PEG20000 est déterminée grâce aux travaux de Parsegian *et al.* (1986) (voir annexe II.2).

La réaction enzymatique est stoppée par ajout de quelques microlitres de solution ferrique puis l'échantillon est rincé dans une solution à 0,1 mol/L de CaCl₂. Il est ensuite stocké dans cette solution pendant une nuit à 4°C avant d'être analysé afin de stabiliser une éventuelle variation de gonflement.

IV.3.c Méthodes d'analyses

IV.3.c.i Dosage du méthanol

Le dosage du méthanol lors de la réaction de PME sur un film est adapté du protocole décrit pour les réactions sur solutions de pectines. Les quantités de réactifs sont adaptés à la quantité en pectines qui peut varier selon la taille du film utilisé ou le ratio des constituants du film. La cinétique de réaction est suivie en prélevant à un temps t , 10 à 100 µL de milieu réactionnel et en le mettant dans le milieu d'oxydation du méthanol. Ce dernier est composé de 2,5 U d'alcool oxydase, 100 µL de MBTH à 3 mg/mL et de solution tampon MOPS complétant le volume de ce milieu à 500 µL. La réaction d'oxydation est effectuée à 30°C pendant 30 min. 200 µL de ce milieu sont alors mis en présence de 200 µL de la solution ferrique pendant 30 min à température ambiante. 600 µL d'eau sont ajoutés et l'absorbance UV mesurée à 620 nm. La détermination de la concentration en méthanol est réalisée grâce à une gamme étalon sans substrat allant de 0,5 à 5 µmol/L de méthanol.

IV.3.c.ii Caractérisations

Dans un premier temps, les propriétés de gonflement et mécaniques sont évaluées sur les films humides.

Après ces essais, l'échantillon est séché pendant environ 48h à 40°C. Les caractérisations structurales tels que la RMN de l'état solide et la détermination du degré de distribution des blocs non-estérifiés sont réalisés à partir des échantillons séchés.

V. Caractérisation des matériaux

V.1 RMN de l'état solide

La structure des matériaux ainsi que les modifications structurales après réaction enzymatique sont caractérisées par RMN de l'état solide.

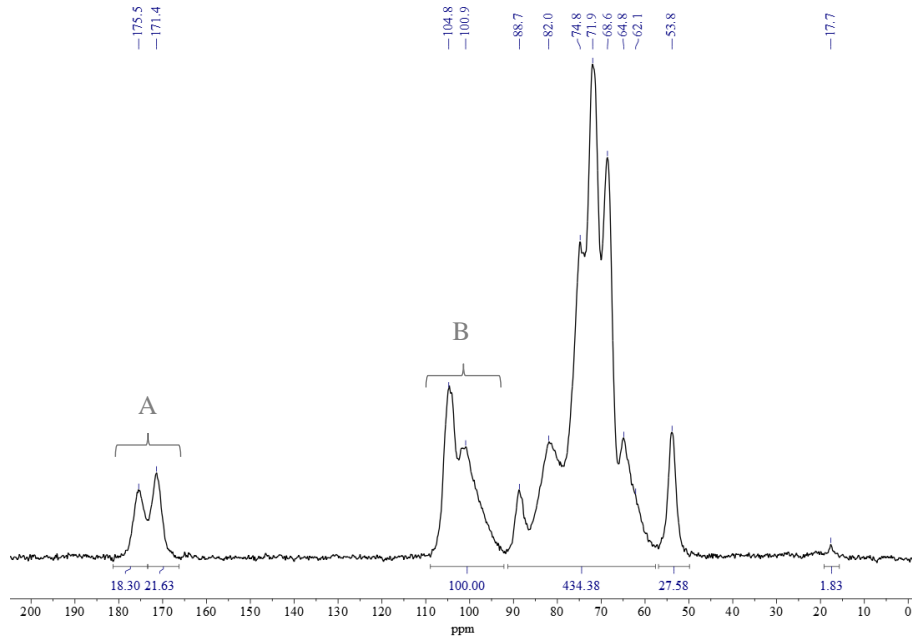


Figure 2.13 : spectre RMN CP-MAS d'un film composé de 30% de MFC et de 70% de P52.

Les déplacements chimiques de la cellulose sont compris entre 60 ppm et 110 ppm (Foster et al., 2018). Le signal à 105 ppm est attribué aux C₁ et le signal à 89 ppm est attribué aux C₄ des régions cristallines. Les signaux des autres carbones sont confondus avec ceux des pectines.

Le ratio massique en pectines des films composés de pectines et de cellulose est vérifié par le calcul de la somme des intégrations des pics du carbone des acides carboxyliques et des esters (171-175 ppm)⁵ corrigée du pourcentage d'homogalacturonanes divisée par la somme des intégrations des pics des carbones C₁ de la cellulose et des pectines. Les masses molaires des unités galacturonanes, prenant en compte le degré de méthylation (équation [2.7]), et des unités glucoses (M = 162 g/mol) sont intégrées au calcul.

Pour le spectre donné en exemple (Figure 2.13), on a :

$$\%P52 = \frac{\frac{I_A * 1,08 * M_{P52}}{\%AGal}}{\frac{I_A * 1,08 * M_{P52}}{\%AGal} + \left(I_B - \frac{I_A * 1,08}{\%AGal} \right) * 162} \quad [2.9]$$

V.2 Gonflement

Le taux de gonflement est déterminé après immersion d'un échantillon dans une solution. La concentration de calcium du milieu d'immersion est contrôlée par ajout de CaCl₂. Selon sa concentration et le volume d'immersion, la quantité de calcium varie et quelques exemples sont donnés dans le tableau suivant.

⁵ Corrigée du facteur de réponse des carbones quaternaires.

Tableau 2.10 : quantité de calcium dans les différents milieux d'immersion.

[Ca ²⁺] (mol/L)	V (mL)	n(Ca ²⁺) (.10 ⁻⁵ mol)
0,001	10	1,0
0,1	0,6	6,0
	10	100

La quantité de calcium présent dans le film initialement varie entre $0,5 \cdot 10^{-5}$ mol et $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol. Pour les solutions d'immersion très faiblement concentrées en calcium, un volume minimal entre 5 mL et 15 mL, selon la composition de l'échantillon, est requis pour fournir un réservoir de calcium équivalent à celui amené par le film. À 0,1 mol/L de calcium, le volume minimal utilisé, 0,6 mL, est suffisant pour avoir un réservoir de calcium supérieur à celui apporté par le film.

Le pH des solutions à 0,1 mol/L ou plus est vérifié et ajusté à 7. Du polyéthylène glycol (PEG), de masse molaire moyenne en masse de 20000 g/mol, est parfois ajouté dans le milieu d'immersion.

Le taux de gonflement (q) des matériaux est déterminé grâce au ratio de la masse du matériau gonflé avec la masse du matériau sec, selon le ratio :

$$q = \frac{m_{humide}}{m_{sec}} \quad [2.10]$$

La masse de l'échantillon sec est mesurée après séchage pendant 2h à 60°C afin d'éliminer d'éventuelles traces d'humidité. La masse de l'échantillon humide est mesurée après immersion dans la solution d'intérêt et après avoir essoré l'excédent de solution à la surface de l'échantillon avec du papier absorbant.

Les équilibres de gonflement sont vérifiés pour les matériaux de composition 70% pectines (P35 ou P52) et 30% MFC après immersion dans 10 mL à 0,1 mol/L de Ca²⁺. L'équilibre est atteint après 1h pour les films à base de P52 et après 30 min pour les films à base de P35.

Les échantillons sont immergés pendant au moins la durée minimale pour atteindre cet équilibre de gonflement (sauf indication contraire).

V.3 Essai de traction uniaxiale

Les propriétés mécaniques élémentaires des échantillons sont mesurées par essais de traction uniaxiale.

Une machine de traction AGS-X (Shimadzu, Kyoto, Japon) est utilisée. Elle est équipée d'un capteur de force de 20 N et de mors plats en caoutchouc à serrage manuel. L'essai est conduit sur échantillon humide de dimensions d'environ 45 x 5 x 0,5 mm mesurées précisément à l'aide d'un pied à coulisse et d'un micromètre. L'excédent de solution sur l'échantillon est essoré avant l'essai. L'échantillon est placé dans un cadre papier afin d'être manipulé facilement lors de sa mise en place dans les mors, et d'éviter son glissement au cours de l'essai. La longueur utile de l'échantillon est fixée à 20 mm et la vitesse de traction à 0,5 %/s. Dans ces conditions, la durée de l'essai est inférieure à 3 min, limitant l'impact du séchage de l'échantillon. Les données sont acquises à l'aide du logiciel Trapezium (Shimadzu). La température de la pièce varie entre 20°C et 25°C.

La déformation est calculée à partir du déplacement de la course transverse du bras de traction. Pour calculer la contrainte, l'aire initiale de la section de l'échantillon humide est utilisée. Le module d'Young E est déterminé comme la pente maximale comprenant 200 points consécutifs de la courbe contrainte-déformation. Cette pente est équivalente à la régression linéaire entre 0,05 MPa et 0,1 MPa de contrainte ou entre 0,2 MPa et 0,6 MPa de contrainte pour les échantillons dont la contrainte maximale à la rupture dépasse 2 MPa (échantillons contenant des pectines P35). 5 échantillons sont testés par conditions et les moyennes de module E (MPa), de déformation à la rupture (%) et de contrainte à la rupture (MPa) sont données. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre les 5 échantillons.

V.4 Essai cyclique et relaxation de contrainte

Les essais de traction uniaxiale cyclique et de relaxation sont effectués par Antoine Dartois, stagiaire, au laboratoire TIMC (Recherche Translationnelle et Innovation en Médecine et Complexité, Grenoble, France). Ils sont réalisés sur des matériaux à base de pectines P35.

Une machine de traction MTS Criterion 40 (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, États-Unis) est utilisée et les données sont acquises à l'aide du logiciel TW Elite (MTS). Cette machine est équipée d'un capteur de force de 25 N et d'un bac d'immersion (non-thermostaté). Les essais sont conduits sur échantillons immergés dans une solution à 0,1 mol/L en CaCl_2 .

L'homogénéité du champ de déformation d'un échantillon est vérifiée à l'aide d'une caméra, par application d'un mouchetis sur l'échantillon et par suivi des points (voir annexe IV.2). Cette méthode permet également de vérifier l'absence de glissement.

Pour le cas des sollicitations cycliques, 10 cycles de traction consécutifs, à 6% de déformation, sont appliqués. Après 30 min de repos, un 11^{ème} cycle de traction à 6% de déformation est réalisé. L'échantillon n'ayant pas de risque de sécher, la vitesse de traction est fixée à 0,158 %/s, une vitesse inférieure aux essais de tractions sur échantillons non immergés.

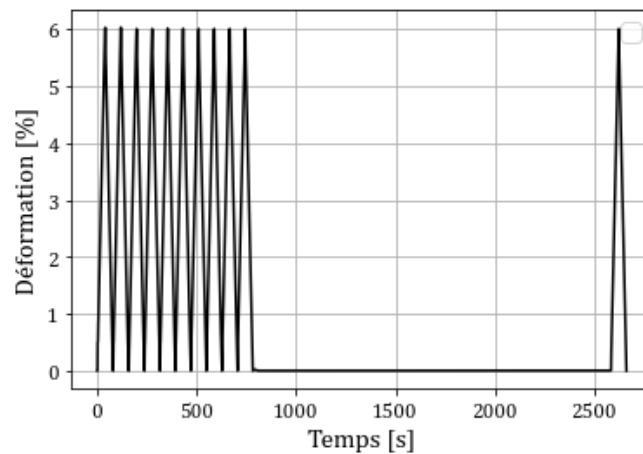


Figure 2.14 : cycles de déformation en fonction du temps appliqués à l'échantillon.

La déformation et la contrainte sont déterminées de la même façon que dans V.3. Le module est déterminé par régression linéaire entre 0,2 MPa et 0,6 MPa de contrainte.

Pour les essais de relaxation de contrainte, une déformation instantanée de 6% est appliquée à l'échantillon. Elle est maintenue constante pendant au moins 12h et la contrainte est mesurée. L'évolution avec le temps de la contrainte normalisée par la contrainte initiale est analysée.

V.5 Fluage

Les essais de fluage sont réalisés par Antoine Dartois sur un banc de fluage WP 600 (Gunt, Hambourg, Allemagne), adapté avec un levier plus court et une cuve étanche. L'essai est réalisé sur l'échantillon immergé dans une solution à 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Des poids sont accrochés au levier afin d'appliquer une contrainte à l'échantillon maintenu par des mors plats.

La déformation de l'échantillon au cours du temps est suivie à l'aide d'un appareil photo. Des photos sont prises à intervalle de temps régulier pendant toute la durée de l'essai. Elles sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Les résultats de ces réactions et caractérisations sont présentés et analysés dans les trois chapitres suivants.

Chapitre 3 : Modèles de paroi cellulaire végétale et comportement physico-chimique

Une des premières ambitions de ce projet est de pouvoir reproduire des matériaux analogues à la paroi primaire d'une cellule végétale. Une paroi primaire est une paroi en croissance qui est composée en majorité de pectines, de cellulose et de xyloglucane chez les dicotylédones (Caffall et Mohnen, 2009). Il est intéressant de mimer ce type de paroi car les dicotylédones sont très étudiées en biologie végétale, et notamment dans la recherche sur la morphogenèse.

Dans ce chapitre, on s'intéressera à la caractérisation des matériaux biomimétiques. Ces matériaux de composition similaire à une paroi primaire sont réalisés par une méthode de casting. Ils sont ensuite étudiés à l'état humide, par analogie avec une paroi végétale composée en grande partie d'eau. Les matériaux sont donc réhydratés, le défi principal étant d'obtenir des matériaux hydratés auto-supportés et homogènes à l'échelle de plusieurs centimètres. Ces aspects sont essentiels pour pouvoir les caractériser ensuite.

Tout comme la paroi primaire, ces matériaux peuvent être définis comme des hydrogels. Cela signifie que leur comportement sera à la fois dépendant des macromolécules les constituant et de la phase aqueuse entourant ces macromolécules. Il s'agit, dans un premier temps, de comprendre le rôle des paramètres physico-chimiques de cette phase aqueuse sur le comportement du matériau et sa structure. L'évolution du gonflement des matériaux lors de leur réhydratation dans différents milieux est d'abord mesurée. L'analyse de leurs performances mécaniques permet ensuite d'établir une relation entre leur structure et leurs propriétés.

On s'intéresse ensuite à la nature des macromolécules constituant les matériaux biomimétiques. Ces derniers acquièrent une structure de gel grâce à la réticulation physique des pectines via des interactions avec des ions calcium. La réticulation du réseau peut être initiée lors de la réhydratation du matériau mais également au moment de sa formation par casting. L'influence de ce facteur sur les propriétés finales du matériau hydraté est d'abord évalué. Les paramètres structuraux des pectines, et notamment leur degré de méthylation (DM), ont aussi un rôle majeur sur les propriétés du matériau en modulant le taux de réticulation du gel. Des matériaux constitués de pectines de DM différents sont comparés pour évaluer ce paramètre.

Les proportions des polysaccharides constituant ces matériaux jouent également un rôle dans la structure et les propriétés du matériau final. Afin de simplifier la mise au point du matériau et l'analyse de son comportement dans différentes phases aqueuses, le xyloglucane n'est pas présent dans les compositions étudiées dans les deux premières parties. Or, c'est aussi un élément majeur de la paroi qui a, de plus, de fortes affinités avec la cellulose. L'influence de la composition du matériau est donc analysée. Finalement, le renforcement apporté par les MFC, qui jouent un rôle de charge dans le gel de pectines, est évalué et vérifié par l'application de modèles mécaniques aux données expérimentales.

Cette première étude a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension du comportement des matériaux hydratés et de son évolution en fonction des propriétés de la phase aqueuse ou de la composition en polysaccharides. Elle permet également d'évaluer quels seront les paramètres de la solution de réhydratation les plus adaptés pour la suite du projet.

I. Comportement de matériaux cellulose/pectines hydratés

Une première paroi modèle simplifiée, constituée de cellulose et pectines, est réalisée. On étudie dans un premier temps des matériaux constitués, secs, de 30% de microfibrilles de cellulose (MFC) et de 70% de pectines méthylées à 52% car ce sont des matériaux d'intérêt pour l'étude des réactions enzymatiques du chapitre 4. Ces compositions sont nommées MFC/P52.

L'influence des paramètres physico-chimiques de la solution de réhydratation sur le gonflement des matériaux MFC/P52 est analysée dans cette partie. En milieu aqueux, les pectines sont des polyélectrolytes en raison des groupements carboxylates présents sur les sucres les constituant. Leur comportement en solution est donc dépendant de nombreux paramètres tels que la présence d'ions chélateurs comme le calcium, la force ionique et le pH (Fraeye et al., 2010b). On cherche d'abord à évaluer le comportement et la structure d'un matériau hydrogel, constitué de pectines, en fonction de son milieu de réhydratation.

Afin d'obtenir des échantillons plus homogènes, le calcium est intégré à la composition initiale du matériau et les pectines sont gélifiées avant séchage (voir annexe I.2). Le taux de réticulation de ces systèmes avant réhydratation est contrôlé par le ratio de calcium intégré à la composition :

$$R = 2 \frac{[Ca^{2+}]}{[-COO^-]} \quad [3.1]$$

En théorie, pour $R = 0,25$, les ions calcium interagissent avec la moitié des acides galacturoniques seulement alors que pour $R = 0,5$, les ions calcium sont en interaction avec l'ensemble des carboxylates et le taux de réticulation est maximal. Ces deux ratios sont utilisés dans cette partie.

I.1 Préambule : gonflement d'un gel polyélectrolyte

Le gonflement d'un gel de polyélectrolytes dépend des paramètres de l'hydrogel et du milieu d'immersion. Il est issu d'une pression osmotique au sein du réseau de polyélectrolyte, π_r , qui est décrite par ces trois contributions :

$$\pi_r = \pi_{mel} + \pi_{ion} + \pi_{el} \quad [3.2]$$

Avec π_{mel} , la pression osmotique résultant de l'interaction entre le solvant et le polymère ; π_{ion} , la pression osmotique due à l'accumulation d'ions mobiles dans le réseau polyélectrolyte ; et π_{el} , la pression exercée par l'élasticité du réseau. Le gonflement atteint l'équilibre quand la pression osmotique dans le réseau est équivalente à la pression osmotique de la solution environnante.

$$\pi_{mel} = \frac{RT}{V} \left(\ln \left(1 - \frac{1}{q} \right) + \frac{1}{q} + \chi \frac{1}{q^2} \right) \quad [3.3]$$

$$\pi_{ion} = \frac{RT(ic)^2}{2C_s \omega v} \quad [3.4]$$

$$\pi_{el} = -G \quad [3.5]$$

Avec R , la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T , la température ; V , le volume molaire du solvant ; q , le taux de gonflement ; χ , le paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère ; i , le degré d'ionisation du polymère ; c , la concentration des unités de répétitions du polymère chargées ; C_s , la concentration ionique du sel de la solution environnante ; v , le nombre d'ions issus de la dissociation du sel ; ω , la valence de l'électrolyte fort issu du sel ; et G , le module dû à l'élasticité du réseau. Il faut noter que l'élasticité du réseau est ici dépendante de la réticulation des pectines mais aussi de la fraction de MFC présente dans le matériau comme démontré dans la partie III de ce chapitre. On a donc $G = f(q)$.

La cinétique de gonflement des matériaux est tout d'abord évaluée. On s'intéresse ensuite à l'effet de la concentration en calcium de la solution de réhydratation, à sa force ionique et à son pH sur le gonflement des matériaux. Ces différents paramètres physico-chimiques vont modifier la composante π_{ion} . Afin de maintenir la pression osmotique au sein du réseau, π_r , équivalente à celle de la solution de réhydratation, le matériau gonflera plus ou moins afin de moduler la composante π_{mel} .

L'intérêt du contrôle de la pression osmotique du milieu de réhydratation à l'aide d'un soluté est aussi évalué. Cette pression osmotique sera dépendante de la concentration du soluté. Le gonflement du matériau permet également dans ce cas d'équilibrer la pression osmotique au sein du réseau, π_r , avec celle de la solution de réhydratation.

I.2 Cinétique de gonflement

Un premier paramètre à connaître est la cinétique de gonflement des matériaux afin de les réhydrater suffisamment longtemps pour être à l'équilibre. Les matériaux utilisés dans cette partie ont été composés avec un ratio $R = 0,25$ en calcium. La cinétique est réalisée dans une solution de réhydratation à $0,1 \text{ mol/L}$ de Ca^{2+} . On peut supposer qu'à cette concentration, des jonctions supplémentaires possibles sont formées lors de la réhydratation.

Le taux de gonflement après réhydratation est déterminé par le ratio massique :

$$q = \frac{m_{gonflé}}{m_{sec}} \quad [3.6]$$

Pour prendre en compte les éventuelles pertes de matière lors de la réhydratation, la masse du matériau sec est mesurée après réhydratation.

L'évolution du taux de gonflement au cours du temps des matériaux MFC/P52 est donnée en Figure 3.1. À une concentration de $0,1 \text{ mol/L}$ de Ca^{2+} , l'équilibre de gonflement est atteint rapidement.

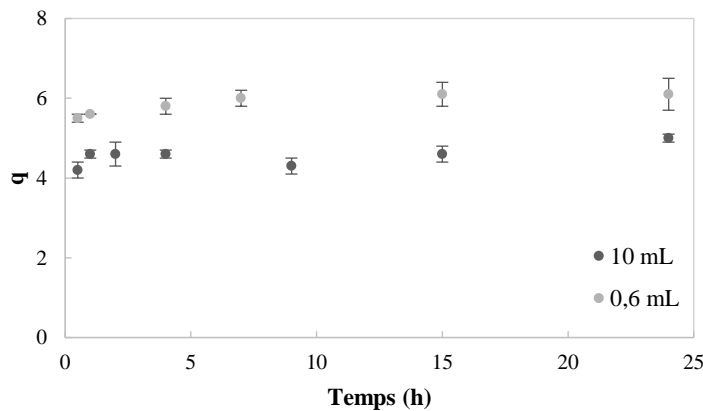


Figure 3.1 : cinétique de gonflement des matériaux MFC/P52 ($R = 0,25$) dans : $V = 10 \text{ mL}$ (noir) ou $0,6 \text{ mL}$ (gris). $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$.

Le volume d'immersion influence la cinétique car pour un trempage dans $0,6 \text{ mL}$, le film met environ 4 h pour atteindre un taux de gonflement maximal contrairement à 1 h lors d'un trempage dans 10 mL .

Le film gonfle également plus lorsqu'il est immergé dans le volume le plus faible. Pour une solution de 10 mL à $0,1 \text{ mol/L}$ de calcium, le nombre de moles de calcium dans la solution ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$) est 100 fois supérieur au nombre de moles de calcium nécessaires pour réticuler complètement les sites déméthylés ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$). Pour une solution de $0,6 \text{ mL}$, il est de $6 \cdot 10^{-5}$, soit 6 fois la quantité suffisante pour une réticulation complète. Dans les deux cas, le calcium est en excès par rapport aux sites de jonctions possibles. Un taux de gonflement supérieur après réhydratation dans $0,6 \text{ mL}$ ne semble donc pas lié à une différence du taux de réticulation des pectines.

Ce phénomène peut cependant s'expliquer par l'augmentation de la concentration des charges du matériau quand le volume d'immersion est plus faible. En effet, les pectines ont une structure complexe et bien que réticulées, certains acides carboxyliques isolés ne peuvent pas former de jonctions calciques.

Ces charges engendrent une pression osmotique, π_{ion} , au sein du matériau. Plus ces charges seront concentrées et plus cette pression sera élevée et contribuera au gonflement du matériau (voir équation [1.3]).

I.3 Effet de la concentration en calcium

Le calcium est un élément clé dans l'étude de ces matériaux. Beaucoup de leurs caractéristiques structurales et de leurs propriétés reposent sur la présence d'un réseau pectines-calcium. Ici, on s'intéresse à comprendre quel rôle va jouer la concentration en Ca^{2+} de la solution d'immersion sur des matériaux déjà composés de jonctions pectines-calcium. Les matériaux utilisés pour cette partie ont été composés avec un ratio $R = 0,25$ en calcium et réhydratés pendant 2h. Dans une solution de 10 mL à 0,001 mol/L, la concentration minimale utilisée, le nombre de mole de calcium est supérieur à celui présent initialement dans le film. Le taux de réticulation ne peut donc pas diminuer lors de la réhydratation mais il peut augmenter.

L'évolution du taux de gonflement des matériaux MFC/P52 en fonction de la concentration en calcium de la solution de réhydratation est donnée en Figure 3.2. L'influence de la concentration en calcium sur le gonflement des matériaux est notable : plus la concentration en calcium est élevée et moins le matériau est gonflé.

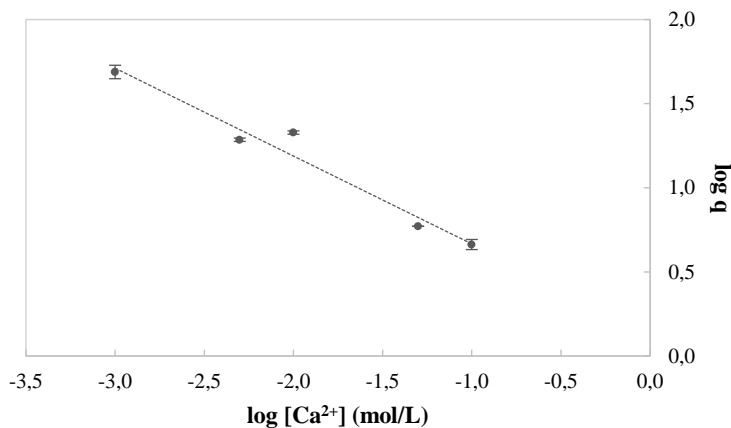


Figure 3.2 : évolution du taux de gonflement avec la concentration en calcium de la phase aqueuse. Réhydratation 2h dans 10 mL. MFC/P52 ($R = 0,25$).

Le logarithme du taux de gonflement varie linéairement avec le logarithme de la concentration en calcium. On obtient donc une relation du type :

$$q = b * \frac{1}{[Ca^{2+}]^a} \quad [3.7]$$

Avec $a = 0,52$ et $b = 1,4$ pour ces matériaux.

La réduction du taux de gonflement avec l'augmentation de la concentration en calcium peut avoir deux origines. Premièrement, il est possible que de nouvelles jonctions pectines-calcium se forment étant donné que le R est initialement égal à 0,25. L'augmentation du taux de réticulation des matériaux engendre une diminution de la contribution π_{el} de l'équation [1.1] ce qui nécessite une diminution du taux de gonflement afin d'équilibrer la pression osmotique du réseau via π_{mel} (équation [1.2]).

Deuxièmement, l'augmentation de la concentration en ions entraîne une diminution de la pression osmotique ionique π_{ion} (équation [1.3]) ce qui contribue de la même façon à la diminution du taux de gonflement.

I.4 Rôle de la force ionique

Comme le calcium contribue à la fois à augmenter la force ionique du milieu, diminuant la pression ionique du réseau polyélectrolyte, et participe activement à des jonctions, il est difficile d'interpréter la contribution de chacun de ces facteurs sur le gonflement du matériau.

Afin de décorrélérer ces deux effets, un autre sel, le chlorure de sodium NaCl, est utilisé pour contrôler la force ionique du milieu d'immersion. Les interactions entre ions monovalents et pectines suivent la théorie de Manning sur les interactions électrostatiques des polyélectrolytes et ne forment probablement pas de jonctions du types « egg-box » (Ralet et al., 2001; Agoda-Tandjawa et al., 2012a).

Les matériaux MFC/P52 utilisés dans cette partie sont initialement composés avec un ratio en calcium $R = 0,5$ afin de réticuler complètement le matériau avant séchage et réhydratation. La durée d'immersion est fixée à 4h pour prendre en compte une éventuelle modification de la cinétique de réhydratation avec la modification de la concentration ionique.

I.4.a Force ionique constante et variation de la concentration en calcium

Dans un premier temps, on étudie le gonflement des matériaux après réhydratation dans des solutions de force ionique constante mais de concentrations en calcium différentes (Tableau 3.1). Une force ionique de 0,3 mol/L, correspondant à celle d'une solution à 0,1 mol/L de CaCl_2 , est fixée. La force ionique est calculée grâce à l'équation [3.8].

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2 \quad [3.8]$$

C_i étant la concentration de l'ion i et Z_i sa charge.

Tableau 3.1 : concentrations en CaCl_2 et NaCl des solutions de réhydratation à force ionique constante.

$[\text{CaCl}_2]$ (mol/L)	$[\text{NaCl}]$ (mol/L)	I (mol/L)
0,001	0,3	0,3
0,01	0,27	0,3
0,05	0,15	0,3
0,1	0	0,3

La Figure 3.3 montre l'évolution du taux de gonflement avec la concentration en calcium à force ionique constante. Les pertes massiques suite à ces différentes réhydratations sont équivalentes.

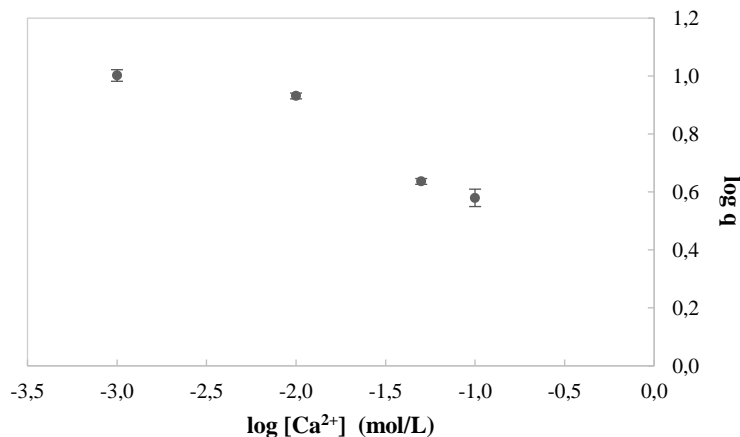


Figure 3.3 : évolution du taux de gonflement avec la concentration en calcium de la phase aqueuse à force ionique $I = 0,3$ mol/L. Réhydratation 4h dans 10 mL. MFC/P52 ($R = 0,5$).

On observe que, malgré une force ionique fixe, le taux de gonflement augmente lorsque la concentration en calcium diminue. Les ions calcium semblent donc avoir un rôle majeur dans la modulation du gonflement du film, même à force ionique élevée. Or, d'après l'équation [1.3], à force ionique constante, la contribution de la pression ionique π_{ion} au sein du gel sur le taux de gonflement est moindre. On peut donc émettre l'hypothèse que le taux de gonflement est contrôlé par une modification du taux de réticulation avec la variation de la concentration en calcium.

Cependant, la concentration minimale de 0,001 mol/L de Ca^{2+} est théoriquement suffisante pour maintenir un ratio molaire en calcium $R = 0,5$ dans le film MFC/P52 et donc un taux de réticulation maximal. Mais, ici, les ions sodium migrent également dans le film par équilibre osmotique. On peut supposer que les ions sodium et les ions calcium sont alors en compétition pour interagir avec les charges

des pectines, comme observé par Sriamornsak et Kennedy (2008). Comme les ions monovalents ne conduisent pas à la formation de jonctions entre pectines, le taux de réticulation diminue lorsque la concentration en ions sodium augmente, ce qui entraîne un gonflement plus important. En revanche à partir de 0,05 mol/L de CaCl_2 , les ions calcium semblent limiter le gonflement du gel grâce aux jonctions pectines-calcium.

En raison de cet échange d'ions, le contrôle de la force ionique par un autre sel non réticulant ne permet pas de confirmer ou exclure la première hypothèse de la partie I.3 *Effet de la concentration en calcium* et de différencier les contributions ioniques et réticulantes des ions calcium lors de la réhydratation.

I.4.b Variation de la force ionique et concentration en calcium constante

L'effet de la force ionique, contrôlée par NaCl, sur le degré de gonflement des matériaux est vérifiée. Dans ces essais, la concentration en calcium du milieu d'immersion est maintenue constante à 0,05 mol/L et la force ionique est modifiée par ajout de NaCl à des concentrations variées (Tableau 3.2). Les matériaux MFC/P52, $R = 0,5$, sont utilisés.

Tableau 3.2 : concentration en NaCl et force ionique des solutions de réhydratation à concentration en CaCl_2 constante.

[NaCl] (mol/L)	[CaCl ₂] (mol/L)	I (mol/L)
0	0,05	0,15
0,025	0,05	0,175
0,05	0,05	0,2
0,1	0,05	0,25
0,3	0,05	0,45

D'après l'équation [1.3], le terme de la pression ionique du gel, π_{ion} , diminue avec l'augmentation de la concentration en sels et donc de la force ionique. Cette diminution de pression osmotique au sein du gel devrait contribuer à limiter son gonflement.

L'évolution du taux de gonflement avec la force ionique, à concentration en calcium constante, est représentée dans la Figure 3.4.

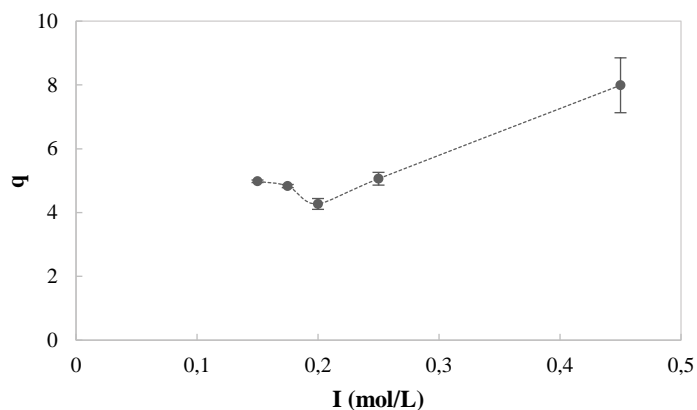


Figure 3.4 : évolution du taux de gonflement avec la force ionique de la phase aqueuse à $[\text{Ca}^{2+}] = 0,05 \text{ mol/L}$. Réhydratation 4h dans 10 mL. MFC/P52 ($R = 0,5$).

On remarque que le taux de gonflement diminue bien quand la force ionique augmente jusqu'à 0,2 mol/L. Cependant une inflexion de la tendance apparaît lorsque la force ionique continue d'augmenter avec une augmentation importante du taux de gonflement.

Ce comportement confirme l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent I.4.a : une compétition d'interactions avec les pectines entre les ions sodium et les ions calcium se produit. Lorsque la concentration en ions Na^+ dépasse celle des ions Ca^{2+} , les ions Na^+ prennent la place des Ca^{2+} ce qui cause une diminution du nombre de jonctions dans le réseau pectique et donc une augmentation de son gonflement.

I.5 Rôle du pH

Les pectines présentent des groupements acides carboxyliques qui sont sensibles aux variations de pH. Le pKa des pectines est entre 3,5 et 4,5 (Plaschina et al., 1978). Les enzymes étudiées par la suite sont actives entre pH 4 et pH 8. Le comportement des films MFC/P52 réhydratés est donc étudié dans cette gamme de pH, tout en veillant à rester au-dessus du pKa (Figure 3.5). De cette manière on s'assure que les acides carboxyliques sont majoritairement déprotonés. La concentration en calcium de la solution de réhydratation est maintenue à 0,1 mol/L.

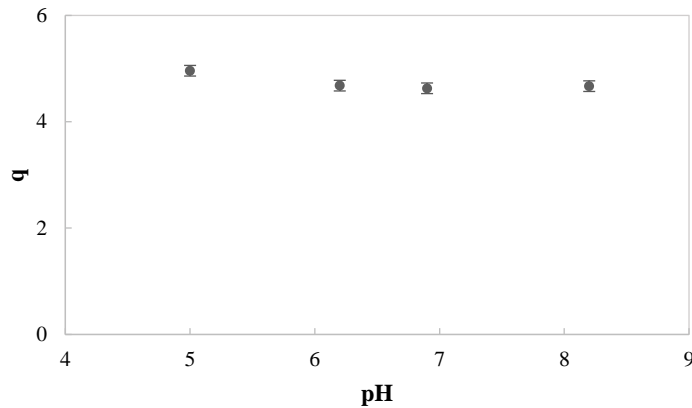


Figure 3.5 : évolution du taux de gonflement avec le pH.
Réhydratation 2h dans 10 mL à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.
MFC/P52 ($R = 0,5$).

On observe qu'il n'y a pas d'effet du pH sur le gonflement entre pH 6 et pH 8. Néanmoins, à pH 5 on peut remarquer une légère augmentation du taux de gonflement, qui passe d'environ 3,7 à 4,0. Ce pH est proche du pKa des pectines et certains sites carboxyliques peuvent se protonner au détriment des jonctions avec les ions calcium. Cela conduit à un réseau moins réticulé qui peut donc plus facilement gonfler.

I.6 Contrôle de la pression osmotique

Il peut être intéressant de pouvoir contrôler le taux de gonflement des matériaux. Une partie du projet vise à étudier les propriétés mécaniques de ces matériaux et, dans le cas d'hydrogels, celles-ci vont être fortement influencées par l'état d'hydratation (Dubrovskii et Rakova, 1997). Pouvoir contrôler le taux de gonflement permet de s'affranchir de l'effet de ce paramètre lorsque l'on souhaite interpréter l'influence d'autres facteurs. On peut également vouloir réduire le taux de gonflement et permettre d'être dans des conditions auto-supportées pour manipuler des matériaux gonflant beaucoup, comme c'est le cas des films immergés dans des solutions faiblement concentrées en calcium. On peut aussi supposer qu'un moindre gonflement, diminuant la distance entre les polysaccharides, pourrait promouvoir des interactions entre eux. L'utilisation de ce contrôle est aussi intéressante pour évaluer l'impact du taux de gonflement des matériaux sur la réactivité enzymatique⁶.

Pour cela, il est possible d'utiliser un co-soluté tel que le polyéthylène glycol (PEG) (Parsegian et al., 1986). La relation entre la concentration massique de PEG, de masse molaire 20000 g/mol, et la pression osmotique de la solution est détaillée en annexe II.2. Dans une solution de PEG, l'activité de l'eau est réduite ce qui engendre une pression osmotique dans le milieu. Un moindre gonflement du matériau est nécessaire pour atteindre l'équilibre entre la pression osmotique du réseau, π_r , avec celle de la solution de réhydratation contenant du PEG (voir équations [1.1] et [1.2]).

I.6.a Évolution du taux de gonflement avec la pression osmotique de la solution de réhydratation

Les matériaux MFC/P52 sont immergés dans des solutions de différentes concentrations en PEG afin d'identifier l'effet de la pression osmotique sur leur gonflement. La solution contient également 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Une gamme de solutions de concentration massique entre 10% et 45% en PEG sont

⁶ Voir chapitre 4.

utilisées. À partir de 45% la solution de PEG devient très fortement visqueuse et difficile à utiliser dans ce contexte. La Figure 3.6 montre l'évolution du taux de gonflement des matériaux en fonction de la concentration massique en PEG.

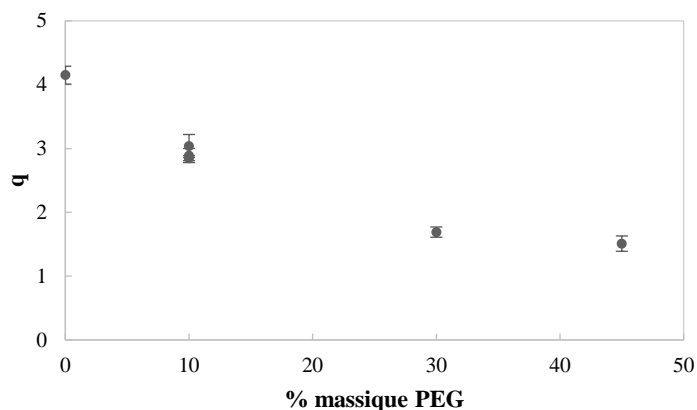


Figure 3.6 : évolution du taux de gonflement avec la concentration massique en PEG. Réhydratation 4h dans 10 mL à $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$. MFC/P52 ($R = 0,25$ ou $0,5$).

Le taux de gonflement semble diminuer de façon quasiment linéaire après trempage dans des solutions entre 0% et 30% de PEG. Au-dessus d'une concentration de 30%, ce qui équivaut à une pression osmotique dans le milieu de réhydratation d'environ 1,5 MPa, le taux de gonflement semble converger vers 1,5.

Une concentration en PEG de 10%, correspondant à une pression osmotique de seulement 0,1 MPa dans le milieu de réhydratation, permet déjà de réduire considérablement le taux de gonflement des matériaux. Cette concentration sera donc utilisée pour plusieurs analyses nécessitant le contrôle du gonflement.

I.6.b Réversibilité de la réhydratation dans une solution à pression osmotique contrôlée

La réversibilité du gonflement dû à une réhydratation dans une solution de PEG a été vérifiée. Une première réhydratation est réalisée dans une solution de PEG, contenant aussi 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Les matériaux sont ensuite rincés dans une solution contenant uniquement du calcium puis séchés. Une deuxième réhydratation est alors réalisée dans une solution à 0,1 mol/L de calcium, sans PEG (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : réversibilité du taux de gonflement après 2 types de réhydratations.

	A	B	C
1^{ère} réhydratation	0,1 mol/L Ca^{2+} + 45% PEG	0,1 mol/L Ca^{2+} + 10% PEG	0,1 mol/L Ca^{2+}
q	1,49 ± 0,05	2,86 ± 0,26	4,49 ± 0,1
2^{nde} réhydratation	0,1 mol/L Ca^{2+}	0,1 mol/L Ca^{2+}	0,1 mol/L Ca^{2+}
q	3,7 ± 0,07	3,8 ± 0,26	3,84 ± 0,07

Deux concentrations en PEG, 45% (A) et 10% (B), sont testées et un contrôle négatif (C) est réalisé. On observe que dans les 3 cas, le taux de gonflement final est identique. Les conséquences physico-chimiques d'une réhydratation dans une solution de PEG sont donc réversibles.

En comparant le taux de gonflement entre la première et la seconde réhydratation du contrôle négatif (C), on observe une diminution de celui-ci. Ce protocole comporte une étape de séchage qui peut être responsable de cet effet (Sriamornsak et Kennedy, 2006). Les interactions créées lors du séchage sont seulement partiellement réversibles.

I.6.c Effet de la concentration en calcium dans une solution de réhydratation à pression osmotique contrôlée

On s'est intéressé à faire varier les paramètres étudiés précédemment, telle que la concentration en calcium, à une pression osmotique contrôlée à 0,1 MPa (solution à 10% de PEG) (Figure 3.7).

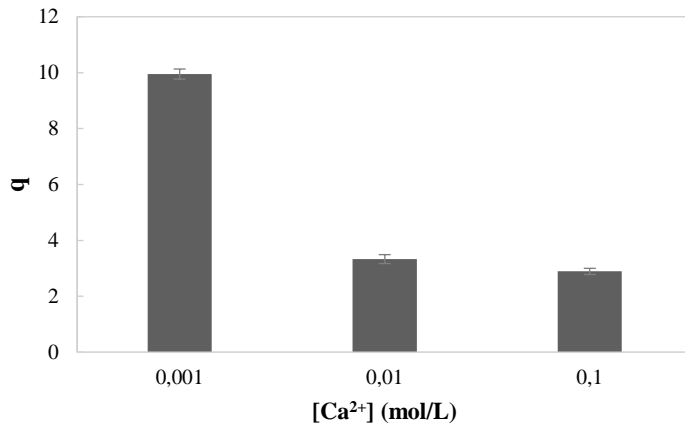


Figure 3.7 : taux de gonflement pour trois milieux de réhydratation de concentrations en calcium différentes. Réhydratation 4h dans 10 mL à [PEG] = 10%. MFC/P52 (R = 0,5).

Le taux de gonflement diminue avec l'augmentation de la concentration en calcium, comme dans le cas des réhydratations sans PEG. L'effet est cependant de moins grande amplitude lorsque la pression osmotique initiale est de 0,1 MPa. Cela permettra de mesurer plus facilement l'influence de la concentration en calcium sur les propriétés mécaniques des films.

I.6.d Effet de la force ionique dans une solution de réhydratation à pression osmotique contrôlée

L'évaluation du rôle la force ionique sur le gonflement des matériaux en présence d'une pression osmotique initiale de 0,1 MPa est aussi réalisée. La Figure 3.8 compare les gonflements après réhydratation sans PEG ou avec PEG, pour deux conditions de forces ionique : 0 et 0,3 mol/L.

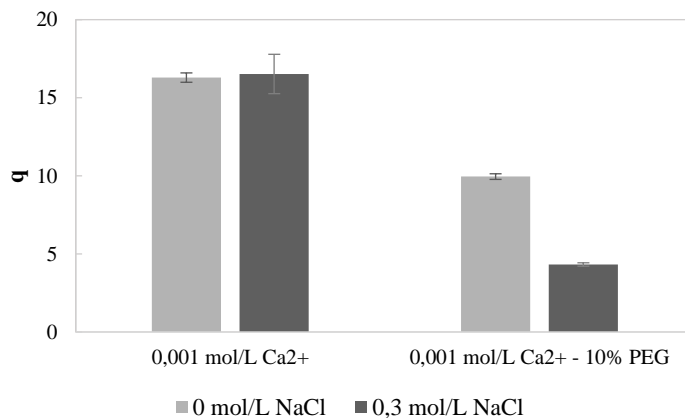


Figure 3.8 : Influence de la force ionique en présence de PEG. Réhydratation 4h dans 10 mL. MFC/P52 (R = 0,5).

Sans pression osmotique instaurée par le PEG, l'effet de la force ionique est contrebalancé par la perte de jonctions due à l'échange des interactions des ions Ca²⁺ par les ions Na⁺ (voir partie I.4 Rôle de la force ionique). En revanche, avec une pression osmotique apportée par 10% de PEG dans la solution de réhydratation, la force ionique contribue à diminuer le taux de gonflement. Cela correspond à un comportement classique d'un polyélectrolyte dont le taux de réticulation n'évolue pas. Ces conditions de réhydratation semblent donc avoir un rôle dans la stabilité des jonctions pectines-calcium.

I.7 Synthèse de la partie I

Ces différentes caractérisations du comportement de gonflement des matériaux MFC/P52 selon le milieu de réhydratation montrent que ce dernier joue un rôle capital dans le contrôle de la physico-chimie du gel de pectines. En raison de la nature polyélectrolyte de ce gel, différents paramètres d'hydratation permettent de moduler les propriétés du matériau : le volume de solvant hydratant ; la concentration en ions calcium (Figure 3.9) ; la présence d'autres ions, leur nature et leur concentration (Figure 3.10) ; le pH ; et la concentration d'un co-soluté.

La réhydratation par une solution à 0,1 mol/L en Ca^{2+} correspond à une teneur en eau de l'ordre de 70% dans le matériau ce qui est comparable à celle d'une paroi cellulaire végétale (Albersheim et al., 2011). Mais cette concentration est potentiellement supérieure à la concentration ionique au sein d'une paroi végétale. Cette dernière est cependant très variable et difficile à estimer. Avec cette forte concentration en calcium, on peut supposer des associations à la fois par des structures « egg-box » et par interactions entre chaînes de pectines favorisées par la force ionique importante.

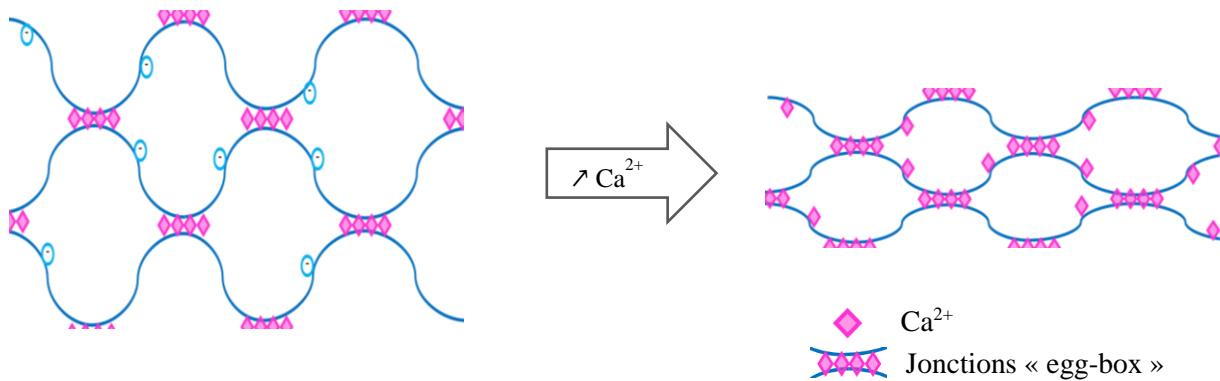


Figure 3.9 : schéma représentant la réduction du gonflement du réseau pectique lorsque la concentration en ion calcium augmente.

Instaurer une force ionique par du chlorure de sodium résulte en un échange des espèces ioniques interagissant avec les charges pectiques. Ce sel ne contient pas d'ion permettant pas de former des jonctions de types « egg-box », cela conduit donc à une diminution du taux de réticulation du réseau pectique. Cette échange d'espèce ionique met en avant la nature réversible des jonctions pectines-calcium.

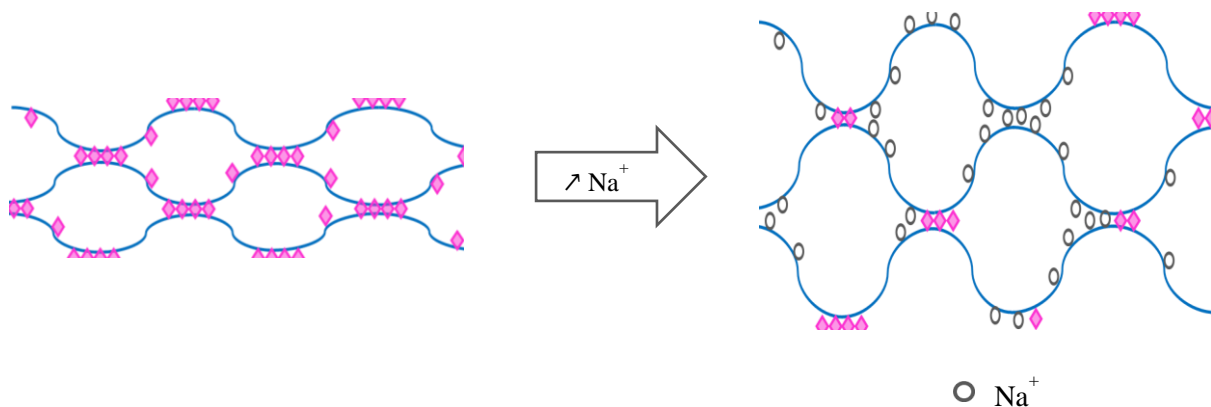


Figure 3.10 : schéma représentant l'augmentation du gonflement du réseau pectique lors de l'ajout d'ions monovalents.

À pH supérieur à 6, le taux de gonflement n'est pas impacté par sa modification car les pectines sont majoritairement déprotonnées.

Le taux de gonflement peut varier avec une grande amplitude selon les conditions de réhydratation des matériaux. Pour les caractériser plus en détail, une étude de leurs propriétés mécaniques est ensuite

réalisée par essais de traction. Or, il n'est pas possible de mesurer des gels très gonflés (q supérieur à 6) avec ce type d'essai. De plus des matériaux à des taux d'hydratation très élevés sont moins représentatifs d'une paroi végétale. Il peut alors être intéressant d'utiliser un soluté, comme le PEG, pour diminuer la différence de pression osmotique entre la solution de réhydratation et le gel et ainsi limiter le gonflement de ce dernier. Une concentration de 10% (m/m) en PEG, correspondant à une pression osmotique de 0,1 MPa, semble suffisante pour remplir ce rôle.

En conclusion, cette première partie a permis d'évaluer le comportement en milieu aqueux de matériaux biomimétiques de la paroi, constitués de cellulose et de pectines de degré de méthylation de 52%. Ceux-ci restent auto-supportés après réhydratation dans des solutions contenant du calcium. Leur caractérisation suite à leur réhydratation dans différentes conditions a permis de mieux comprendre les paramètres contrôlant leurs propriétés. Celles-ci sont modulées par le degré d'ionisation des pectines, dépendant de la concentration des espèces ioniques. Les jonctions pectines-calcium, assurant la gélification de ce matériau, sont stabilisées par des interactions physiques qui sont elles aussi sensibles aux caractéristiques ioniques du milieu de réhydratation. Enfin, une stratégie de contrôle de la pression osmotique du milieu de réhydratation peut permettre de moduler le gonflement du gel pectique.

II. Conséquences des paramètres physico-chimiques sur les propriétés mécaniques des matériaux MFC/pectines

Un deuxième axe d'étude de ces matériaux est présenté dans cette partie. Les matériaux semblent être structurés différemment selon le milieu de réhydratation, comme le montrent les caractéristiques de gonflement variées obtenues. Il est alors intéressant d'essayer de relier ces caractéristiques structurelles aux propriétés mécaniques macroscopiques du matériau.

On cherche dans un premier temps à établir une relation entre le taux de gonflement et les performances mécaniques des matériaux, la composition initiale et le taux de réticulation étant constant. Il est connu que le module d'un gel décroît avec l'augmentation de son gonflement. En théorie, dans un cas idéal et en supposant le gonflement isotrope, la relation entre le module de cisaillement G et le taux de gonflement est définie par (Flory et Rehner, 1943a) :

$$G = G_0 \left(\frac{1}{q}\right)^{1/3} \quad [3.9]$$

Cependant, expérimentalement, des relations avec une puissance supérieure à $1/3$ sont souvent observées (Dubrovskii et Rakova, 1997). En supposant notre matériau incompressible, car majoritairement composé d'eau, on peut définir pour le module d'Young :

$$E = 3G_0 \left(\frac{1}{q}\right)^{1/3} \quad [3.10]$$

Le module G_0 est directement relié aux paramètres du réseau macromoléculaire et notamment à la densité de réticulation, par :

$$G_0 = \nu kT \quad [3.11]$$

Avec G_0 , le module de cisaillement (en Pa) ; k , la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K) ; ν , la densité de réticulation (en m^{-3}). On peut alors estimer une densité de réticulation de nos matériaux après réhydratation dans différentes conditions.

On s'intéresse ensuite à l'influence du taux de réticulation du gel pectique sur les propriétés des matériaux. Un paramètre crucial dans le contrôle de la réticulation des pectines est leur DM. Moins le DM est élevé et plus il y a de sites carboxylates disponibles pour former des jonctions avec les ions calcium. Des matériaux constitués de pectines faiblement méthylées (DM = 31%), nommés MFC/P35, sont étudiés et comparés aux matériaux MFC/P52.

Globalement, les échantillons auto-supportés et dont le taux de gonflement est inférieur à 6 peuvent être testés par essai de traction. Cet essai permet d'extraire des propriétés mécaniques fondamentales telles que le module d'Young (E), mesuré dans la zone d'élasticité linéaire, la contrainte maximale (σ_{max}), correspondant ici à la contrainte à la rupture, et le pourcentage de déformation maximal (ϵ_{max}). Il permet la caractérisation des matériaux biomimétiques dans des conditions analogues à l'extension que peut subir une paroi végétale lors de sa croissance.

II.1 Relation entre le gonflement et les propriétés mécaniques des matériaux MFC/P52

Les performances mécaniques d'un gel étant liées à son taux gonflement (Flory et Rehner, 1943a), les paramètres du milieu de réhydratation auront aussi un impact sur celles-ci. Des gels de pectines ont déjà été beaucoup étudiés mais dans des configurations éloignées de celles d'une paroi végétale. Des comparaisons avec nos matériaux peuvent cependant être réalisées.

Une synthèse des propriétés des matériaux MFC/P52, réhydratés dans 10 mL de différentes solutions de réhydratation et présentés dans la partie I, est présentée dans le Tableau 3.4.

Trois types de conditions sont conservées, correspondant aux situations où le taux de réticulation des matériaux est supposé constant.

Il est difficile de mesurer des propriétés mécaniques de matériaux fortement gonflés. Dans le but de quantifier l'évolution des propriétés avec l'évolution de la concentration en calcium du milieu d'immersion, des essais sont réalisés par réhydratation dans une solution de PEG à 10%, en faisant varier la concentration en calcium de 0,001 à 0,1 mol/L. La solution de PEG permet de diminuer l'amplitude du gonflement (voir partie I.6.c *Effet de la concentration en calcium dans une solution de réhydratation à pression osmotique contrôlée*).

Tableau 3.4 : taux de gonflement et propriétés mécaniques des matériaux réhydratés dans différentes conditions.

Conditions de réhydratation			Propriétés du matériau hydraté			
%PEG	[Ca ²⁺] (mol/L)	pH	q	E (MPa)	σ _{max} (MPa)	ε _{max} (%)
<i>Variation de [PEG]</i>						
0	0,1	7	4,15 ± 0,14	2,4 ± 0,2	0,17 ± 0,05	11,1 ± 3,1
10	0,1	7	2,85 ± 0,04	13,7 ± 0,8	0,89 ± 0,11	14,6 ± 2,3
30	0,1	7	1,69 ± 0,08	339,4 ± 25,7	7,8 ± 0,8	9,8 ± 1,3
45	0,1	7	1,51 ± 0,12	1,2.10 ³ ± 0,2.10 ³	25,11 ± 4,2	7,4 ± 0,5
<i>Variation de [Ca²⁺]</i>						
10	0,001	7	9,95 ± 0,18	-	-	-
10	0,01	7	3,33 ± 0,16	3,6 ± 0,1	0,27 ± 0,06	10,5 ± 2,3
10	0,1	7	2,89 ± 0,11	6,6 ± 0,5	0,55 ± 0,07	13,5 ± 2,0
<i>Variation du pH</i>						
0	0,1	5	4,96 ± 0,04	1,9 ± 0,2	0,21 ± 0,06	15,5 ± 4,6
0	0,1	6,2	4,68 ± 0,05	1,9 ± 0,1	0,17 ± 0,06	11,7 ± 2,9
0	0,1	6,9	4,63 ± 0,12	2,1 ± 0,2	0,20 ± 0,07	13,1 ± 4,6
0	0,1	8,2	4,67 ± 0,08	2,5 ± 0,1	0,26 ± 0,04	13,4 ± 2,3

On observe que les performances mécaniques sont dépendantes du taux de gonflement q : le module et la contrainte à la rupture diminuent tandis que la déformation à la rupture a plutôt tendance à augmenter avec l'augmentation du gonflement. La Figure 3.11 donne l'évolution, en logarithme, du module élastique avec le taux de gonflement.

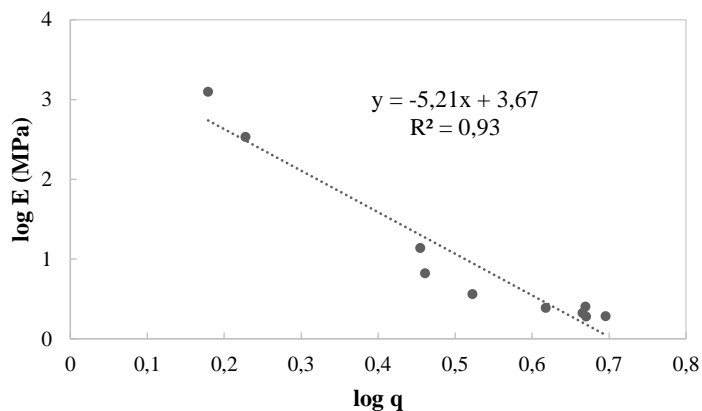


Figure 3.11 : évolution logarithmique du module avec le taux de gonflement des matériaux MFC/P52 réhydratés.

Cette représentation permet d'extraire une relation entre le module d'élasticité et le taux de gonflement du matériau.

On obtient pour les matériaux MFC/P52, réhydratés dans différentes conditions, une relation globale :

$$E \text{ (Pa)} = 3 * 1,6. 10^9 * \left(\frac{1}{q}\right)^{5,2} \quad [3.12]$$

Soit un taux de réticulation estimé à : $\nu \approx 3,9.10^{29} \text{ m}^{-3}$. Le taux de réticulation permet de calculer une masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation M_r :

$$M_r = \frac{N_A * \rho}{\nu} \quad [3.13]$$

Avec N_A , la constante d'Avogadro ($N_A = 6,022.10^{23} \text{ mol}^{-1}$) et ρ , la masse volumique du réseau (en kg/m^3). En prenant la masse volumique du réseau égale à la masse volumique des polysaccharides (environ 1500 kg/m^3), on obtient une masse $M_r \approx 2 \text{ g/mol}$. L'ordre de grandeur est 100000 fois plus faible que la masse molaire moyenne en nombre des pectines P52 (voir chapitre 2), ce qui paraît aberrant.

De plus, on observe que ces gels s'éloignent du cas idéal décrit par Flory et Rehner et des gels reportés dans la littérature (Dubrovskii et Rakova, 1997). Dans cette référence, des dépendances de module avec l'inverse du gonflement à une puissance inférieure à 1 sont décrits, alors que dans le cas présent, le module est proportionnel à l'inverse du gonflement à une puissance égale à 5,2.

Cela peut s'expliquer par la complexité des matériaux étudiés. Ces derniers sont effectivement des composites constitués d'une matrice de pectines et de charges cellululosiques. En plus de diluer le taux de réticulation, l'augmentation du taux de gonflement dilue également la concentration des charges dans le matériau. Ce paramètre a aussi de l'influence sur les propriétés mécaniques des matériaux composites et il sera étudié dans la partie III *Comportement des matériaux biomimétiques en fonction de leur composition en cellulose, pectines et xyloglucane*.

Les parties suivantes décrivent plus en détails l'effet de chaque paramètre de la solution de réhydratation sur les propriétés mécaniques des matériaux.

II.1.a Contrôle de la pression osmotique

L'augmentation de la pression osmotique réduit fortement le taux de gonflement des matériaux (voir partie I.6.a *Évolution du taux de gonflement avec la pression osmotique de la solution de réhydratation*). Cette réduction du taux de gonflement conduit à une modification des propriétés en traction des matériaux (Figure 3.12).

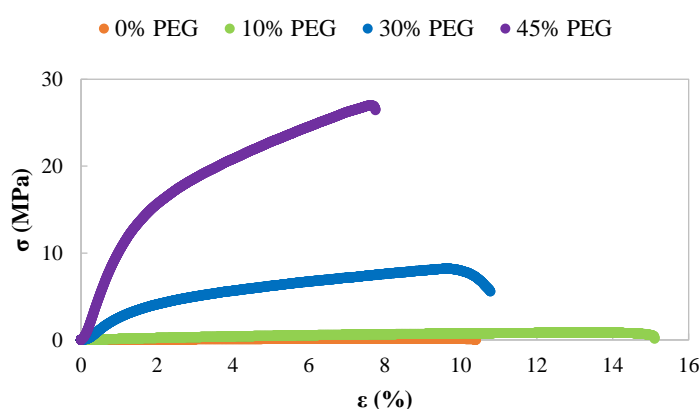


Figure 3.12 : courbes de tractions des matériaux MFC/P52 ($R = 0,25$) hydratés dans 0%, 10%, 30% ou 45% de PEG. $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7$.

Le contrôle du taux de gonflement grâce à la pression osmotique permet d'obtenir des caractéristiques mécaniques variées (Tableau 3.4). En l'absence de pression osmotique, le module d'Young est de l'ordre de 1 MPa. Il est multiplié par 10 dès lors que la pression osmotique de la solution de réhydratation est élevée à 0,1 MPa et il atteint les gigapascals pour une pression de 4,5 MPa. À cette pression, le taux de gonflement est de seulement de 0,5, on se rapproche donc des propriétés de ce type de matériaux à l'état sec (Stelte et Sanadi, 2009).

II.1.b Concentration en calcium

Même dans une solution à 10% en PEG, le taux de gonflement des échantillons réhydratés dans 0,001 mol/L de Ca^{2+} est très élevé et il n'est pas possible d'effectuer les essais de traction. En comparant les deux conditions restantes (Figure 3.13), on observe un doublement du module d'Young lorsque la concentration en calcium de la solution est multiplié par 10.

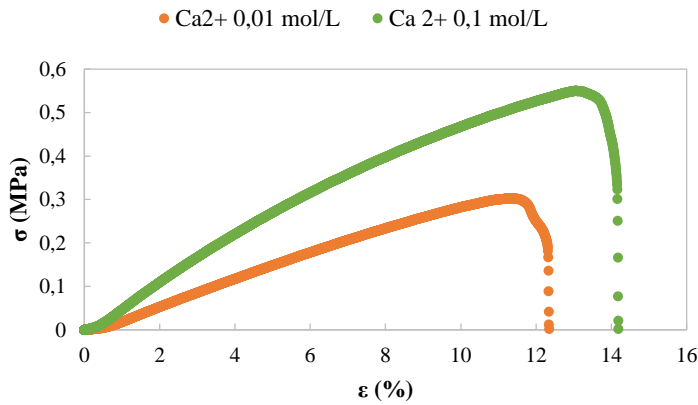


Figure 3.13 : courbes de tractions des matériaux MFC/P52 ($R = 0,5$) hydratés dans 0,01 mol/L ou 0,1 mol/L de Ca^{2+} . $[\text{PEG}] = 10\%$, $\text{pH} = 7$.

II.1.c Rôle du pH

Dans la partie précédente, un effet du pH sur le taux de gonflement était observable seulement à pH 5. On s'attend à une diminution du module d'Young à ce pH, correspondant à la perte de jonction pectines-calcium. Ce n'est cependant pas ce qui est mesuré (Figure 3.14). S'il y a une diminution de la densité de réticulation physique, elle est trop minime pour avoir un réel impact sur le module. La différence du taux de gonflement peut aussi être dû à un biais de mesure.

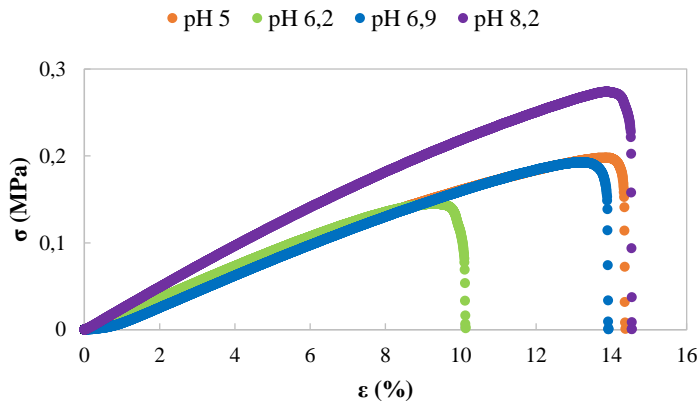


Figure 3.14 : courbes de tractions des matériaux MFC/P52 ($R = 0,5$) hydratés à différents pH. $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$ et $\text{PEG} = 0\%$.

À pH 8, il semble y avoir une légère augmentation du module d'Young malgré un taux de gonflement équivalent aux autres conditions. Les propriétés à la rupture, déformation et contrainte, ne sont pas significativement impactée par le pH. On peut en conclure que dans cette gamme de pH, l'impact de la physico-chimie du milieu sur les propriétés mécaniques est négligeable.

Finalement, même à un taux de réticulation constant, les propriétés mécaniques de ces matériaux peuvent être modulées grâce à la variation de leur gonflement en fonction des caractéristiques de la phase aqueuse.

On se pose ensuite la question de quel est l'impact d'une modification du taux de réticulation des pectines sur les propriétés des matériaux.

II.2 Influence du taux de réticulation du réseau pectique sur les propriétés des matériaux MFC/pectines

Dans cette partie, les propriétés des matériaux cellulose/pectines, composé de 70% de pectines, sont analysées selon le degré de réticulation du gel pectique formé initialement. Ce dernier est directement lié au DM des pectines.

Comme vu dans la partie I *Comportement de matériaux cellulose/pectines hydratés*, le comportement des gels polyélectrolytes dépend aussi de leur degré d'ionisation. On peut supposer que ce paramètre est également dépendant du DM des pectines car une différence de DM peut modifier la concentration de charges isolées non réticulées.

Pour évaluer ces facteurs, deux types de matériaux sont comparés : ceux composés avec des pectines méthylées à 52% (MFC/P52) et ceux composés avec des pectines faiblement méthylées (MFC/P35). Les matériaux utilisés dans cette partie ont été composés avec un ratio initial $R = 0,25$ en calcium. Le taux de gonflement et les propriétés mécaniques de ces différents matériaux sont caractérisées après leur réhydratation dans une solution contenant du calcium.

II.2.a Impact sur le gonflement

À la fois le DM et la distribution des motifs d'estérification des pectines va influencer sur leur comportement de polyélectrolyte. Comparer la variation du gonflement des matériaux MFC/P35 et MFC/P52 selon le milieu de réhydratation permet de mettre en avant les conséquences de ces deux paramètres propres aux pectines sur les matériaux.

II.2.a.i Selon la concentration en calcium

Dans la partie précédente, il a été montré que le gonflement des matériaux MFC/P52 était dépendant de la concentration en calcium de la solution de réhydratation. Le gonflement des matériaux MFC/P35 diminue aussi avec l'augmentation de la concentration en calcium de la solution de réhydratation, comme observé dans la Figure 3.15.

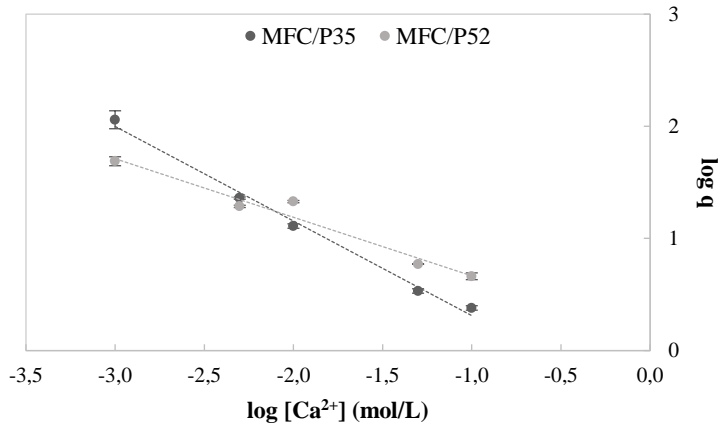


Figure 3.15 : évolution du taux de gonflement des matériaux MFC/P35 (noir) et MFC/P52 (gris) avec la concentration en calcium de la phase aqueuse. Réhydratation 2h dans 10 mL. $R = 0,25$.

L'amplitude de variation du taux de gonflement est cependant différente selon le type de pectines. Le logarithme du taux de gonflement varie linéairement avec le logarithme de la concentration en calcium (équation [3.7]). Les paramètres a et b de cette droite sont comparés pour chaque composition dans le tableau suivant.

Tableau 3.5 : comparaison des paramètres issues de la relation entre le taux de gonflement des matériaux et la concentration en calcium du milieu de réhydratation.

Matériau	a	b
MFC/P35	0,84	0,3
MFC/P52	0,52	1,4

On remarque que la concentration en calcium a plus d'influence sur le taux de gonflement des matériaux avec les pectines les moins méthylées. Ces dernières ont plus de possibilités de former de nouvelles jonctions lors de la réhydratation du matériau. Aussi, d'après l'équation [1.3], la pression osmotique

ionique π_{ion} est fortement dépendante de la concentration de charges du polyélectrolyte. À faible concentration en ions calcium, le matériau MFC/P35 gonfle plus que le matériau MFC/P52. On suppose donc que malgré les jonctions pectines- Ca^{2+} , les pectines P35 restent plus ionisées que les pectines P52 à cette faible concentration en calcium. Mais à haute concentration en calcium, les charges du polyélectrolytes sont écrantées à la fois par les jonctions et par le phénomène de condensation des contre-ions (pour les charges ne participant pas à une jonction). Dans ce cas, la pression osmotique ionique, π_{ion} , est équivalente dans les deux matériaux et le taux de gonflement est principalement contrôlé par l'élasticité du réseau. Le matériau MFC/P52 gonfle plus que le matériau MFC/P35 dans ces conditions car son degré de réticulation est plus faible.

II.2.a.ii Selon la force ionique

De la même façon que dans la partie concernant uniquement les matériaux MFC/P52, I.1.c.ii *Variation de la force ionique et concentration en calcium constante*, l'effet de la force ionique sur les matériaux MFC/P35 est étudié. La force ionique est augmentée par ajout de NaCl dans le milieu de réhydratation à concentration en calcium fixe (0,05 mol/L). L'évolution du taux de gonflement avec la force ionique est représentée dans la Figure 3.16 et comparée à celle mesurée pour les matériaux MFC/P52.

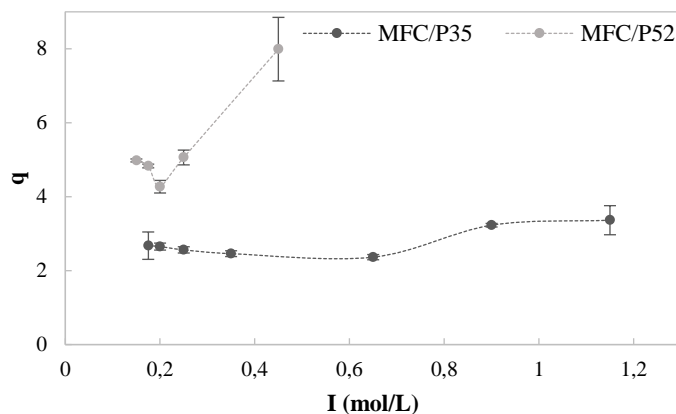


Figure 3.16 : évolution du taux de gonflement des matériaux MFC/P35 (noir) et MFC/P52 (gris) avec la force ionique de la phase aqueuse. Réhydratation 4h dans 10 mL. $[Ca^{2+}] = 0,05$ mol/L. Lignes pointillées : guides d'œil.

On peut observer une légère diminution du taux de gonflement, lorsque la force ionique passe de 0,175 à 0,6 mol/L, qui provient d'une diminution de la pression ionique du gel π_{ion} d'après l'équation [1.3]. Cette faible dépendance avec la force ionique semble indiquer qu'à 0,05 mol/L de Ca^{2+} , avec jusqu'à environ 0,5 mol/L de Na^+ , les sites non méthylés sont majoritairement associés dans des jonctions calciques et ne participent pas à la pression osmotique du réseau polyélectrolyte.

Cependant, lorsque la quantité de NaCl augmente et la force ionique dépasse 0,6 mol/L, on peut remarquer une légère hausse du taux de gonflement. Comme expliqué pour les matériaux MFC/P52, cela résulte probablement d'un échange des ions calcium par les ions sodium dans le réseau pectique créant une diminution du taux de réticulation du gel. Cette augmentation est cependant de moins grande ampleur et intervient pour des concentrations en sodium très élevées par rapport à ce qui est observé avec les matériaux MFC/P52. Les jonctions calciques des gels de pectines P35 sont plus nombreuses et on peut supposer que l'enchaînement de sites non méthylés mène à des jonctions plus longues. Une quantité d'ions sodium importante est alors nécessaire pour réduire le taux de réticulation.

Contrairement à l'effet de la concentration en calcium sur les matériaux MFC/P35, la force ionique générée par le NaCl influe donc peu sur ces derniers en comparaison avec les matériaux contenant des pectines plus méthylées.

II.2.b Impact sur les propriétés mécaniques

Le degré de méthylestérification a un rôle majeur dans la formation des jonctions pectines-calcium. L'étude du comportement physico-chimique de matériaux composés de pectines de DM différent a déjà montré une réponse distincte concernant le taux de gonflement. De ces observations on peut déduire que la structure des matériaux est différente selon le DM.

II.2.b.i Comparaison des matériaux avec des pectines de DM différent

Les propriétés mécaniques des matériaux sont comparées après réhydratation dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Deux courbes d'essai de traction, représentant la contrainte en fonction du pourcentage de déformation, sont données pour comparer la réponse mécanique de ces deux types matériaux (Figure 3.17).

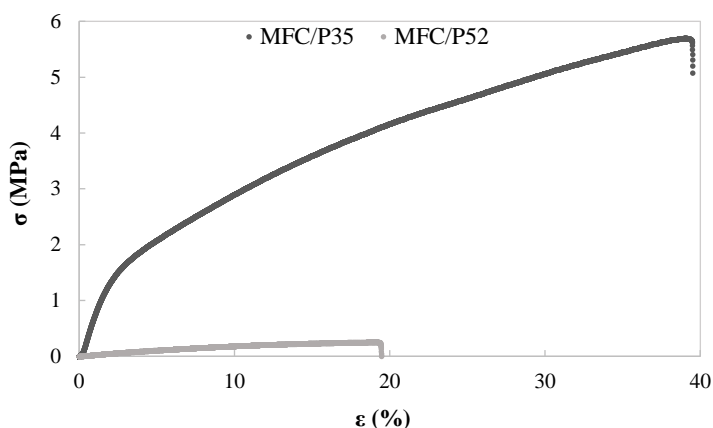


Figure 3.17 : comparaison des courbes de traction des matériaux MFC/P35 (noir) et MFC/P52 (gris) réhydratés. $R = 0,25$ et $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$.

La différence de DM entre les pectines utilisées pour chaque composition, 31% et 52%, induit des comportements très différents. Le film à base de P52 est fragile et il a un module d'Young faible. Une force faible est requise pour déformer de 20% l'échantillon. Le film à base de P35 est plus rigide, son module d'Young est 30 fois supérieur. Il peut cependant se déformer 2 fois plus tout en résistant à une force presque 20 fois supérieure à celle supportée par un échantillon à base de P52.

Tableau 3.6 : comparaison du taux de gonflement et des propriétés mécaniques des matériaux MFC/P35 et MFC/P52 réhydratés. $R = 0,25$ et $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$.

Matériau	q	σ_{max} (MPa)	ϵ_{max} (%)	E (MPa)
MFC/P35	2,4	$5,6 \pm 0,4$	$42,3 \pm 2,3$	$84,8 \pm 7,2$
MFC/P52	4,0	$0,3 \pm 0,0$	$18,6 \pm 2,1$	$2,8 \pm 0,5$

L'augmentation des propriétés des matériaux composés de pectines P35 s'explique par la différence de taux de gonflement et par la présence de plus de jonctions pectines-calcium.

II.2.b.ii Estimation du taux de réticulation des matériaux MFC/P35

Comme pour les matériaux MFC/P52, on peut évaluer le taux de réticulation des matériaux MFC/P35 en analysant la relation entre leur module d'Young et leur taux de gonflement. Les données sont issues de la caractérisation des matériaux de la partie II.2.a.i, pour lesquels le taux de gonflement est modulé par la concentration en calcium de la solution de réhydratation.

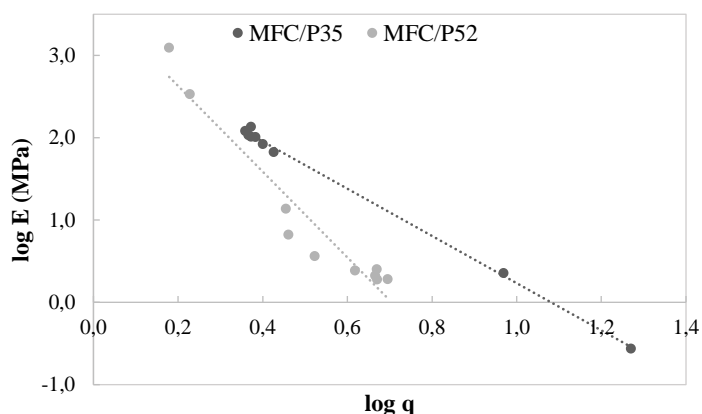


Figure 3.18 : comparaison de l'évolution logarithmique du module avec le taux de gonflement des matériaux MFC/P52 et MFC/P35 réhydratés.

Pour les matériaux MFC/P35, on obtient alors la relation suivante :

$$E (Pa) = 3 * 0,4. 10^9 * \left(\frac{1}{q}\right)^{2,9} \quad [3.14]$$

On remarque que comparé aux matériaux MFC/P52, le module des matériaux MFC/P35 est moins fortement dépendant du gonflement des matériaux. La puissance n et le taux de réticulation v , calculé à partir de la pente de la droite et de l'équation [3.11], des deux matériaux sont comparés dans le tableau suivant.

Tableau 3.7 : comparaison des paramètres issues de la relation entre le module et le taux de gonflement des matériaux MFC/P35 et MFC/P52.

Matériau	$v (m^{-3})$	n
MFC/P35	$9,9.10^{28}$	2,9
MFC/P52	$3,9.10^{29}$	5,2

D'après cette relation, le taux de réticulation des matériaux MFC/P35 serait moins grand que celui des matériaux MFC/P52. Or en raison du plus faible DM des pectines P35, ce résultat semble aberrant. Comme mentionné dans la partie II.1, *Relation entre le gonflement et les propriétés mécaniques des matériaux MFC/P52*, la variation du taux de MFC avec la variation du gonflement du matériau entraîne probablement une modification du module des matériaux qui n'est pas pris en compte dans la relation [1.6] décrite pour des gels non chargés.

II.3 Synthèse de la partie II

Cette partie s'est intéressée à analyser le rôle de paramètres physico-chimiques tels que le milieu de réhydratation et le taux de réticulation des pectines sur les propriétés mécaniques des matériaux.

On a pu voir qu'une variation de 20% du DM des pectines peut mener à des matériaux aux propriétés très différentes en raison de l'augmentation du degré de réticulation. Il sera alors intéressant de vérifier si les mêmes propriétés peuvent être retrouvées en déméthylant les pectines par voie enzymatique (voir chapitre 4).

Comme pour des gels classiques, les propriétés mécaniques des matériaux biomimétiques sont liées à leur taux de gonflement. Cependant on a pu observer une dépendance du module avec le taux de gonflement très largement supérieure à ce qui est généralement reporté pour des gels (Dubrovskii et Rakova, 1997). Ces matériaux sont en effet constitués de charges celluloseuses dont la fraction volumique influe sur les propriétés mécaniques. Cette influence semble néanmoins moins importante lorsque les matériaux sont constitués de pectines faiblement méthylées.

Une étude plus approfondie du rôle des charges dans ce matériau est réalisée dans la partie suivante en étudiant des matériaux de composition en polysaccharides variés.

III. Comportement des matériaux biomimétiques en fonction de leur composition en cellulose, pectines et xyloglucane

Dans cette partie, on cherche à évaluer le comportement des matériaux selon leur composition en polysaccharides. Cette étude a fait l'objet d'un stage de Master 2, réalisé par Chaeryun Yeom.

Les objectifs sont d'une part : l'étude des comportements physico-chimique et mécanique de ces matériaux, dans le but d'interpréter l'influence de chaque composant sur leurs propriétés ; et d'autre part : la reproduction d'une paroi cellulaire végétale plus proche de la réalité en y intégrant le 3^{ème} élément majeur, le xyloglucane.

En effet, la contribution du xyloglucane aux propriétés des parois primaires n'est pas tout à fait clair. Il est souvent admis que ce polysaccharide assure un rôle de structuration en connectant les microfibrilles entre elles mais ce modèle a aussi été remis en cause par des caractérisations RMN de la paroi (Cosgrove, 2014). Ce matériau biomimétique peut éventuellement être décrit comme un réseau des pectines interpénétré par un réseau cellulose/xyloglucane.

De plus, les MFC assurent aussi un rôle de charges rigides dans ce matériau composite. Dans les parties précédentes, on a vu que les propriétés des matériaux dépendent du taux de gonflement des gels de pectines. Celui-ci modifie également la concentration de charges rigides.

Afin de simplifier l'étude, seules les pectines de DM égal à 52% sont utilisées dans les compositions décrites dans cette partie. Les compositions sont nommées selon les pourcentages massiques de chacun des polysaccharides dans le matériau initial sec. Les mêmes stratégies expérimentales que dans les parties précédentes sont appliquées : les taux de gonflement sont d'abord évalués et les propriétés mécaniques sont ensuite déterminées par essai de traction. Comme le système est tri-composants, l'augmentation de l'un des composants induit la réduction de la proportion des autres composants. On a donc cherché à élaborer des séries d'échantillons en fixant le ratio massique d'un des composants tout en faisant varier les deux autres.

III.1 Comportement de gonflement selon la composition

Une quinzaine de matériaux de différentes compositions en pectines, MFC et xyloglucane (XG) ont été réalisés. Le R initial est fixé à 0,5. Avant d'être caractérisés, les matériaux sont réhydratés dans une solution de PEG à 10% et à 0,1 mol/L de Ca²⁺.

I.1.a Influence des proportions de pectines et de XG sur le gonflement des matériaux

On sait que les pectines se lient aux cations calcium pour former un réseau de type « egg-box ». Le modèle suggère que ces liaisons non covalentes sont stabilisées par des interactions électrostatiques, de van der Waals et des liaisons hydrogènes. Dans la partie précédente, il a été montré que le réseau pectines-calcium joue un rôle majeur dans le comportement des matériaux biomimétiques à l'état humide.

D'un autre côté, le XG est connu pour interagir très favorablement avec la cellulose (Jean et al., 2009). La formation de connexions entre MFC grâce aux chaînes de XG, comme proposé dans le modèle d'architecture de la paroi primaire de McCann et Roberts (1994), est également possible dans ces matériaux.

On s'intéresse donc à évaluer l'effet de la variation des pourcentages de ces deux composants. Des matériaux dont les proportions de MFC sont fixées soit à 30% soit à 60% sont utilisés pour cette analyse.

La Figure 3.19 illustre les taux de gonflement obtenus selon le pourcentage de pectines dans la composition initiale.

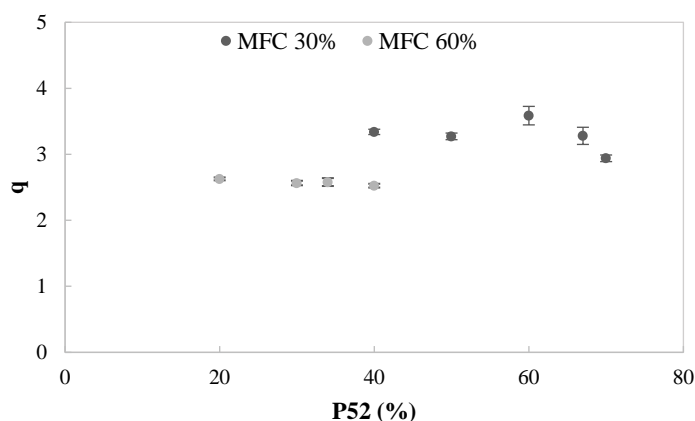


Figure 3.19 : évolution du taux de gonflement en fonction du pourcentage de pectines P52 dans la composition du matériau. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

On peut observer que le taux de gonflement est globalement indépendant du ratio de pectines, aux proportions de MFC à la fois de 30% et de 60%. Il a été montré dans la partie I, qu'à cette concentration en calcium, le gonflement du gel pectique est principalement lié au taux de réticulation. En effet, la pression osmotique ionique, π_{ion} , du réseau est négligeable car les charges des pectines sont masquées par la condensation des contre-ions. La variation de la concentration des pectines n'est donc pas un facteur impactant le gonflement du réseau dans ces conditions de réhydratation.

Les pourcentages de xyloglucane varient également, en relation avec les pourcentages de pectines. On en conclut alors la même indépendance du taux de gonflement avec la composition en xyloglucane. Pour faciliter l'analyse, selon les ratios en XG, les mêmes compositions que pour la Figure 3.19 sont représentées dans le graphe suivant en fonction du pourcentage de XG.

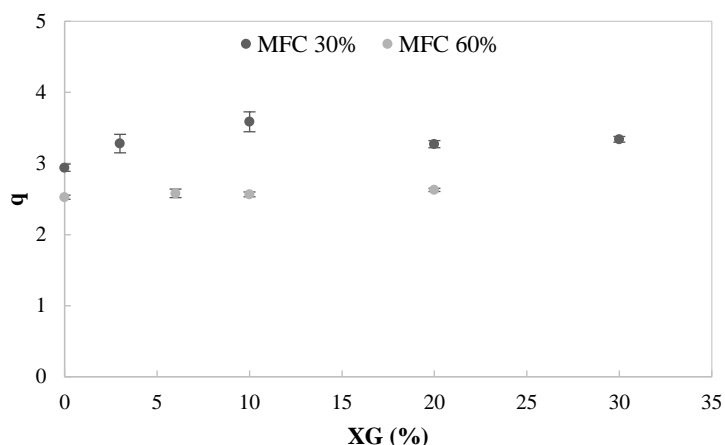


Figure 3.20 : évolution du taux de gonflement en fonction du pourcentage de XG dans la composition du matériau. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

Il a été montré, dans le cas de nanocristaux de cellulose (Navon, 2020) et vérifié pour ces MFC (voir annexe II.3) qu'entre 10% et 20% de xyloglucane par rapport à la cellulose s'y adsorbe effectivement. À partir de ce ratio, les cristaux de cellulose sont recouverts de XG ce qui empêche la création d'interactions supplémentaires et le XG additionnel est considéré libre. S'il y a formation de jonctions entre MFC grâce aux molécules de XG, leur nombre est donc indépendant du ratio de XG au-delà de 3% (ou de 6% selon les proportions de MFC) de XG dans la composition. On remarque bien que l'ajout de XG n'a pas ou très peu d'influence sur le taux de gonflement, tout comme l'augmentation du pourcentage de XG libre.

Le gonflement des matériaux constitués de MFC, XG et de pectines méthylées à 52%, suite à une réhydratation dans une solution de PEG à 10% et à 0,1 mol/L de Ca^{2+} , semble donc être indépendant des proportions en XG et en pectines. Cela facilitera l'analyse des propriétés mécanique de ces séries.

On peut par contre déjà observer, grâce à ces deux séries de matériaux, qu'une modification des proportions de MFC dans la composition des matériaux conduit à un changement significatif de leur gonflement.

III.1.a Influence de la proportion en cellulose sur le gonflement des matériaux

Comme observé dans les figures précédentes, une variation de 30% des proportions initiales en MFC semble avoir une grande influence sur le gonflement des matériaux. Afin d'évaluer plus précisément cet effet, le taux de gonflement de l'ensemble des compositions réalisées est reporté dans la Figure 3.21 en fonction du pourcentage de MFC.

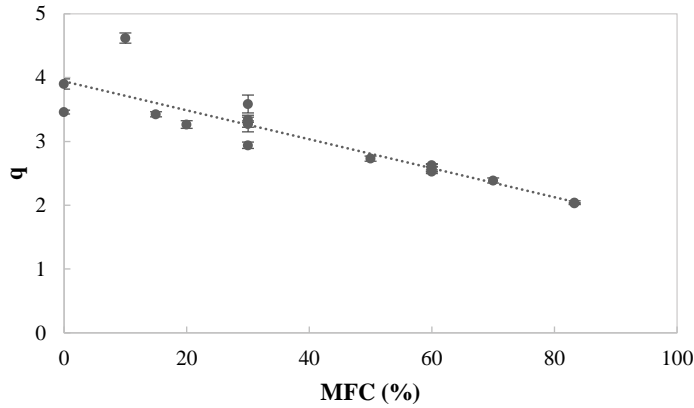


Figure 3.21 : évolution du taux de gonflement en fonction du pourcentage de MFC dans la composition du matériau. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

Il y a une corrélation qui semble être linéaire entre le taux de gonflement et le ratio de MFC dans le matériau. Les résultats de la partie précédente suggèrent que les variations de proportions en pectines et xyloglucane n'ont pas d'influence sur le gonflement des matériaux. On peut cependant vérifier si la tendance de réduction du gonflement avec l'augmentation de la fraction de MFC est aussi observée lorsque la proportion de pectines est invariante. Le taux de gonflement des matériaux dont la composition en pectines est fixée à 70% et les taux de MFC et XG sont variables sont représentés dans la Figure 3.22. Dans ce cas précis, le gonflement diminue aussi avec l'augmentation du pourcentage de MFC dans la composition.

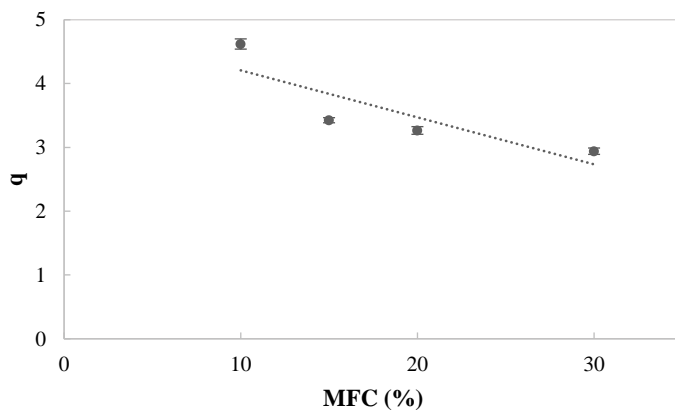


Figure 3.22 : évolution du taux de gonflement en fonction du pourcentage de MFC pour des matériaux contenant 70% de P52. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

La présence de ces nanoparticules rigides et allongées ont un rôle conséquent sur le taux de gonflement du matériau. Cette évolution peut résulter d'une modification de l'élasticité de l'hydrogel chargé (voir équation [1.1] et [1.4]). Une description détaillée des performances mécaniques des gels en fonction du taux de charges MFC est présentée plus loin dans cette partie.

III.2 Comportement en traction selon la composition

Les propriétés mécaniques selon les proportions de XG et pectines, les proportions de MFC étant fixées à 30% ou 60%, sont d'abord évaluées. Une analyse de l'évolution du comportement mécanique selon le taux de charges MFC est ensuite réalisée. Tous les essais sont réalisés après réhydratation des matériaux par immersion dans une solution à 10% de PEG et à 0,1 mol/L de Ca^{2+} .

III.2.a Influence des proportions en XG et pectines sur les propriétés mécaniques

Bien que le taux de gonflement des matériaux soit globalement indépendant des proportions de XG et de pectines, ce comportement peut aussi résulter d'une compensation des différents paramètres contrôlant le gonflement. On cherche donc à étudier les implications que pourraient avoir ces polysaccharides sur leurs performances mécaniques. Le xyloglucane interagissant très favorablement avec la cellulose, son insertion dans la composition des films peut mener à la formation d'un deuxième réseau (en plus du réseau pectines-calcium). Il est alors intéressant d'évaluer à quel point ce nouveau réseau ainsi que la présence de chaînes de xyloglucane libres vont modifier les propriétés mécaniques des matériaux biomimétiques. L'importante masse molaire du xyloglucane pourrait mener à plus d'enchevêtrements entre molécules et donc à un accroissement de la viscoélasticité du matériau. Le taux de réticulation du réseau pectique étant constant, on suppose que la variation de ses proportions aura peu d'influence sur les propriétés du matériau.

Les matériaux, étudiés dans la partie I.1.a *Influence des proportions de pectines et de XG sur le gonflement des matériaux*, dont les proportions de MFC sont fixées à 30% et à 60% sont analysés ici. On s'intéresse principalement au module d'élasticité pour cette analyse. Le taux de gonflement de ces compositions est indépendant des proportions en pectines et XG, les mesures de module d'Young sont donc directement comparables. Leur évolution avec les proportions de xyloglucane est représentée dans la figure suivante.

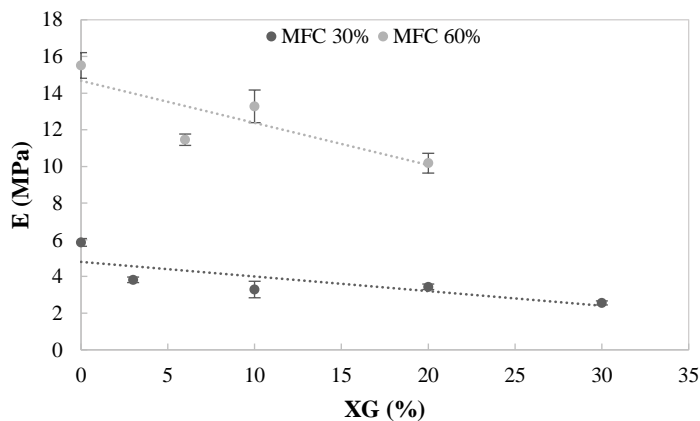


Figure 3.23 : évolution du module d'Young en fonction du pourcentage de XG dans la composition du matériau. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$.

Le module d'Young décroît légèrement et de façon linéaire avec l'augmentation du ratio de xyloglucane. La quantité de xyloglucane ajoutée est au moins égale à la quantité de xyloglucane se liant aux MFC, le xyloglucane libre peut donc agir comme un plastifiant et impacter légèrement le comportement élastique des matériaux. La pente décroît cependant plus lorsque les proportions de MFC sont élevées. Cette dépendance linéaire avec la fraction de XG est donc aussi dépendante de la fraction volumique de MFC. La formation du réseau pectique peut aussi être légèrement impactée par la présence d'une concentration de MFC plus importante, sans que cela ne soit suffisant pour modifier significativement le taux de gonflement.

Il semble que, dans ces matériaux biomimétiques, la réticulation des pectines avec le calcium contribue significativement plus à l'élasticité du matériau que les éventuelles interactions formées entre la cellulose et le xyloglucane. En effet, le module des compositions ne contenant pas de xyloglucane est supérieur (d'environ 30% pour les compositions MFC 60% et d'environ 80% pour les compositions MFC 30%) à celui des autres compositions. La tendance observée semble d'ailleurs tendre vers un module proche de 0 MPa si la proportion de XG était augmentée jusqu'à 100%, ce qui suggère que le XG n'apporte aucune contribution aux propriétés élastiques.

La dépendance du module avec les proportions de XG et de pectines est cependant faible. Cette observation est en accord avec la littérature. En effet, Agoda-Tandjawa *et al.* (2012a) ont observé que les propriétés rhéologiques de gels pectines-MFC sont principalement contrôlées par les MFC. Aussi, à l'état humide, le xyloglucane n'apporte pas d'augmentation des performances mécaniques des matériaux cellulosiques (Gaffiot, 2017).

Il est alors plus intéressant d'analyser l'évolution globale des propriétés de ces matériaux en fonction de la fraction volumique de MFC.

III.2.b Influence de la fraction volumique de MFC sur les propriétés mécaniques

Comme observé lors de l'analyse des taux de gonflement, la variation des proportions de MFC semble avoir un effet majeur sur les caractéristiques des matériaux.

III.2.b.i Évolution de l'ensemble des propriétés

Afin de déterminer l'évolution des propriétés mécaniques avec les proportions de MFC des matériaux, des essais de traction sont réalisés sur des compositions de teneur croissante en MFC. Afin d'éviter la présence de molécule de XG libre, son ratio a été fixé à 10% du ratio de MFC. Par exemple, la composition MFC 30% est composée de 30% de MFC, 3% de XG et de 67% de pectines.

Les courbes représentatives des essais de traction de chaque composition, montrant la contrainte (σ) en fonction de la déformation (ϵ), sont données dans la figure suivante.

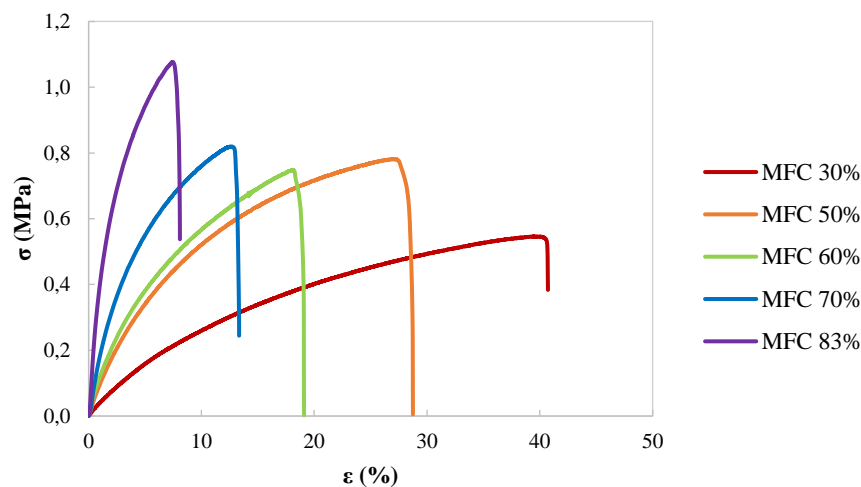


Figure 3.24 : courbes de traction de matériaux MFC/P52/XG constitués de différents ratio en polysaccharides. Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

Il est clair que le module d'Young augmente avec l'augmentation du pourcentage de MFC dans la composition du matériau. Cette accroissement de module s'accompagne aussi d'une réduction de la déformation à la rupture et d'une augmentation de la contrainte à la rupture lorsque la teneur en cellulose augmente. Par conséquent, les MFC influencent à la fois la déformation, la résistance à la traction et la rigidité des films et ont un effet de renforcement du matériau. Ce comportement est classique pour des composites renforcés par des charges cellulosiques (Favier, 1995).

III.2.b.ii Évolution des propriétés à la rupture avec la quantité de MFC

On s'intéresse dans un premier temps aux propriétés à la rupture. La Figure 3.25 et la Figure 3.26 montrent les évolutions respectives de la contrainte et de la déformation à la rupture en fonction de la fraction volumique de MFC dans la composition, pour l'ensemble des compositions réalisées et dont les taux de gonflement ont été présentés dans la partie III.1.a *Influence de la proportion en cellulose sur le gonflement des matériaux*.

Pour évaluer les propriétés mécaniques de ces matériaux, il est nécessaire de s'affranchir de la variation du gonflement car celui-ci diminue avec l'augmentation du pourcentage de MFC. Or, comme démontré dans la partie I de ce chapitre, le comportement en traction des matériaux et leur taux de gonflement sont dépendants. Pour s'affranchir du rôle du gonflement dans les analyses qui suivent, les différentes propriétés mécaniques sont représentées en fonction de la fraction volumique de cellulose, calculée à partir du volume du matériau gonflé.

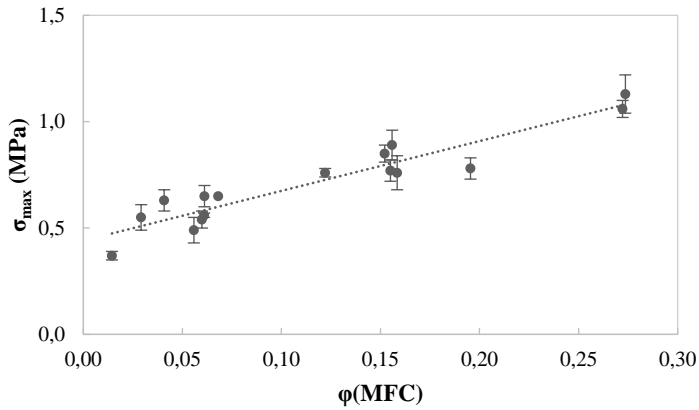


Figure 3.25 : évolution de la contrainte à la rupture en fonction de la fraction volumique de MFC.
Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

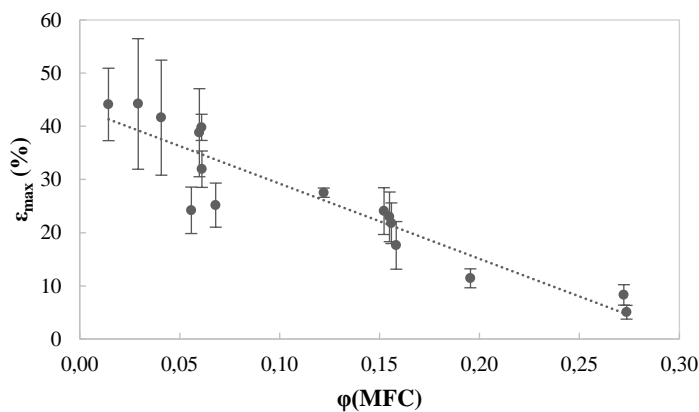


Figure 3.26 : évolution de la déformation à la rupture en fonction de la fraction volumique de MFC.
Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

Les propriétés à la rupture semblent évoluer de façon linéaire avec la fraction volumique de MFC. À faible fraction de MFC, les matériaux sont néanmoins plus fragiles ce qui entraîne des résultats plus hétérogènes.

Une étude du renforcement lié aux MFC est réalisée dans la partie suivante avec les modules d'élasticité.

III.2.b.iii Évolution du module d'élasticité avec la quantité de MFC

Le module d'élasticité permet de décrire plus précisément le renforcement apporté par les MFC. La Figure 3.27 montre l'évolution du module d'Young en fonction de la fraction volumique de MFC, pour l'ensemble des compositions.

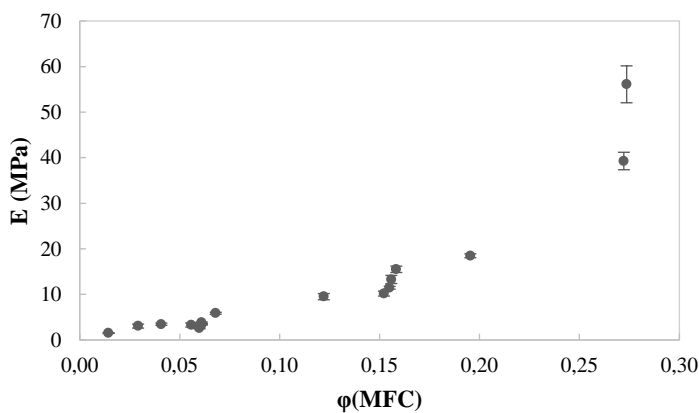


Figure 3.27 : évolution du module d'Young en fonction de la fraction volumique de MFC.
Réhydratation 4h dans 10 mL à 10% en PEG et à $[Ca^{2+}] = 0,1$ mol/L.

On observe que lorsque la proportion de cellulose est faible, le module d'Young du film augmente presque linéairement avec la quantité de cellulose. Lorsque le taux de charges cellulosiques dépasse 0,1 (ce qui équivaut à environ 40% de cellulose dans le matériau sec), le module d'Young augmente

rapidement. La tendance de renforcement des matériaux MFC/P52/XG n'est donc pas linéaire avec la fraction volumique de MFC.

III.2.b.iv Modélisation de l'évolution du module d'élasticité avec la fraction volumique de MFC

La description du comportement élastique de matériaux renforcés par des MFC doit tenir compte de leur géométrie particulière. Les MFC sont des fibres et ont donc un facteur de forme important. De plus, lors de la filmification du matériau, les fibrilles s'orientent de façon aléatoire mais se disposent parallèlement à la surface du film. Le matériau est donc orthotrope avec une orientation uniplanaire.

III.2.b.iv.1 Modèle d'Halpin-Kardos

Pour décrire ce type de composite, le modèle d'Halpin-Kardos (1976), prenant en compte l'anisotropie du renfort, a déjà été utilisé. Dans l'étude de Favier *et al.* (1995), il est envisagé en premier lieu pour estimer le renforcement de composites constitués de nanocristaux de cellulose non orientés.

Le modèle d'Halpin-Kardos s'appuie sur la combinaison de plusieurs couches anisotropes, chaque couche correspondant à une orientation des fibres, pour décrire un matériau quasi-isotrope. Ce modèle considère le cas de fibres courtes et n'inclue donc aucune contribution due à des interactions entre charges.

Le module est alors calculé à partir des caractéristiques des fibres et de la matrice dans ces plans. Les modules longitudinal, transversal et de cisaillement d'un cristal de cellulose, d'après Favier *et al.* (1995), sont donnés dans le Tableau 3.8.

Tableau 3.8 : modules d'un cristal de cellulose selon la direction de sollicitation.

E_{11f} (GPa)	150
E_{22f} (GPa)	15
G_f (GPa)	5

Tableau 3.9 : facteurs géométriques des MFC selon la direction de sollicitation.

ζ₁₁	100
ζ₂₂	2
ζ₁₂	1

Des facteurs géométriques ζ, traduisant le renfort lié à la géométrie des charges, sont calculés en considérant les fibres cylindriques avec un facteur de forme de 50⁷ (Tableau 3.9).

Les facteurs de poisson ν_m et ν_f sont défini à 0,5, la matrice étant principalement composée d'eau et les fibrilles considérées incompressibles. Un module de cisaillement de la matrice, composée du gel de pectines et du xyloglucane, G_m de 0,5 MPa permet d'ajuster au mieux le modèle aux valeurs expérimentales pour des fractions volumiques de cellulose inférieures à 0,2 (Figure 3.28). Ce module de cisaillement est cohérent pour un gel de pectines (Ström *et al.*, 2007). Le détail des équations du modèle d'Halpin-Kardos est donné en annexe II.4.

Les modules calculés grâce à ce modèle en fonction de la fraction volumique de cellulose sont représentés et comparés aux valeurs expérimentales dans la figure suivante.

⁷ Rapport L/d avec une longueur de 1 μm et un diamètre de 20 nm

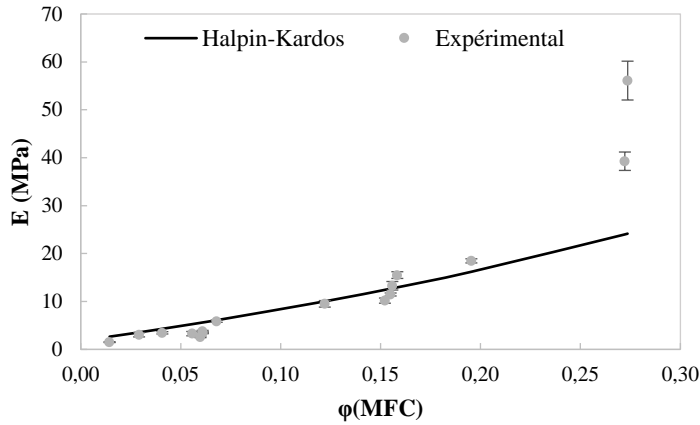


Figure 3.28 : comparaison du modèle d'Halpin-Kardos (noir) avec les données expérimentales (gris).

Le modèle semble bien adapté pour décrire les résultats expérimentaux pour des fractions volumiques de MFC inférieures à 0,2. Au-delà d'une fraction volumique de MFC de 0,2, les résultats expérimentaux semblent dévier de ce modèle. Il est reporté dans la littérature que le modèle semi-empirique d'Halpin-Kardos s'éloigne des résultats expérimentaux pour des fortes concentrations en charges en raison de l'accroissement des interactions entre les charges (Lewis et Nielsen, 1970; Favier, 1995). Dans le cas des matériaux composites cellulosiques non hydratés, un phénomène de percolation assuré par la présence d'interactions hydrogènes fortes entre les fibres de cellulose est responsable de cette déviation (Favier, 1995). Mais en milieu hydraté, ces interactions sont affaiblies voire absentes.

III.2.b.iv.2 Modèle de Jones et Marques

Dans notre cas, l'augmentation du module avec la fraction volumique de MFC peut résulter de l'augmentation des enchevêtrements entre MFC. Les suspensions de MFC ont en effet un comportement de gel élastique en raison de la longueur des fibrilles qui permet leur enchevêtrement (Pääkkö et al., 2007). Ce comportement est souvent décrit grâce au modèle de Jones et Marques (Jones et Marques, 1990; Nechyporchuk et al., 2016). Selon celui-ci, le module de solutions de fibres rigides varie selon une loi de puissance avec la concentration en fibres :

$$G \propto C^n \quad [3.15]$$

Pour les MFC, des valeurs de n entre 2,25 et 5,2 sont reportées dans la littérature selon les caractéristiques de la suspension. Une autre théorie prédit la modification de n de 11/3 à 7 lorsque la concentration augmente (Hill, 2008).

On réalise alors une combinaison linéaire de cette loi avec le modèle d'Halpin-Kardos (E_{HK}) envisagé préalablement :

$$E = E_{HK} + b * \varphi_{MFC}^n \quad [3.16]$$

Les mêmes paramètres que précédemment sont utilisés pour E_{HK} et les valeurs de b et n sont ajustées pour faire correspondre le modèle aux données expérimentales. Des valeurs de n entre 2 et 7 sont testées.

La combinaison de paramètres suivante permet de décrire le comportement de nos matériaux en fonction de la fraction volumique de MFC :

b	13000
n	5

Cette combinaison est représentée et comparée aux résultats expérimentaux dans la Figure 3.29.

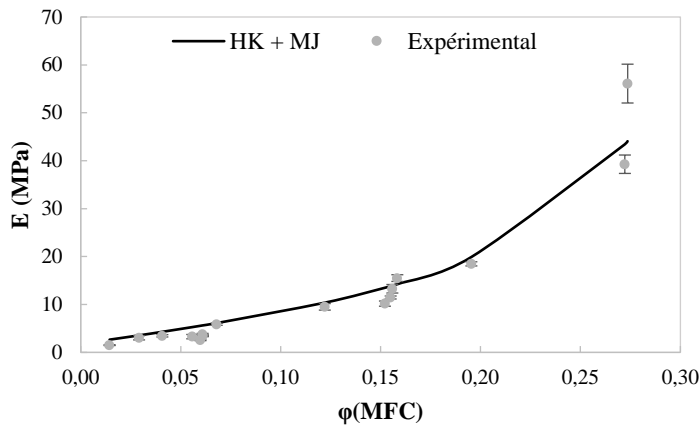


Figure 3.29 : comparaison des données expérimentales (gris) avec le modèle combinant celui d'Halpin-Kardos et celui de Jones et Marques (noir).

Elle semble pouvoir décrire le comportement des matériaux sur l'ensemble des fractions volumiques étudiées. Cependant, plusieurs combinaisons de ces paramètres permettent d'ajuster le modèle aux points expérimentaux présents. Des données expérimentales supplémentaires pour des fractions entre 0,20 et 0,27 pourraient permettre d'affiner les valeurs de n et b . Aussi, la signification physique du paramètre b reste peu évidente à interpréter.

En conclusion, l'évolution du module de nos matériaux en fonction de la fraction volumique de MFC peut être décrite de façon qualitative par la combinaison du renfort des charges anisotropes rigides dans une matrice souple et de l'enchevêtrement des charges fibrillaires entre elles à haute concentration de charges.

III.3 Synthèse de la partie III

Dans cette partie, on s'est intéressé à l'influence de chaque polysaccharide sur les propriétés des matériaux biomimétiques de la paroi végétale réhydratés. Dans des conditions de réhydratation similaires pour chaque composition, les variations des fractions de pectines et de xyloglucane ont peu de conséquences sur le gonflement et les propriétés mécaniques. On note tout de même une légère diminution du module d'Young avec l'ajout de xyloglucane dans la composition. Cela suggère que la contribution du xyloglucane à l'élasticité des matériaux biomimétiques est négligeable.

Il semble que c'est principalement la variation de la fraction de MFC qui influence les propriétés des matériaux. Pour illustrer ce résultat, un résumé des modules obtenus pour des matériaux MFC/P52 réhydratés dans une solution à 10% de PEG et 0,1 mol/L de Ca^{2+} est présenté dans un diagramme ternaire (Figure 3.30). Chaque côté du triangle indique la proportion de chaque polysaccharide dans le film. La couleur du point indique l'ordre de grandeur du module d'Young : plus le point est proche du rouge, plus le module d'Young est élevé, et plus la couleur du point est proche du vert, plus le module d'Young est faible.

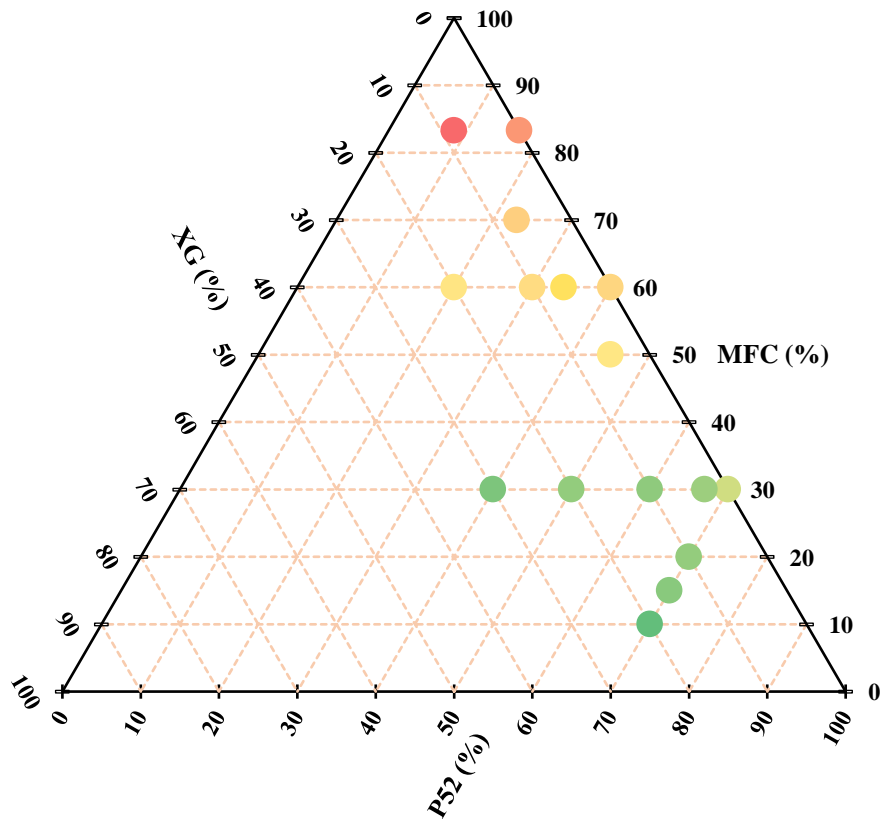


Figure 3.30 : diagramme ternaire des compositions présentées dans la partie III. L'amplitude du module est indiquée par un code couleur : du vert au rouge = du plus faible au plus élevé.

Ce diagramme ternaire met bien en évidence l'influence majeure des MFC sur les propriétés élastiques des matériaux biomimétiques. Ce comportement peut être expliqué en raison des caractéristiques des MFC qui sont des fibres agissant comme des charges dans la matrice de l'hydrogel.

L'évolution du module d'Young des matériaux en fonction de la fraction volumique de MFC a pu être correctement modélisé grâce à la combinaison de deux phénomènes traduits par des modèles empiriques. Le premier modèle, Halpin-Kardos, permet de décrire le renfort apporté par des fibres courtes dans un composite et le deuxième, Jones-Marques, traduit les conséquences de l'enchevêtrement de fibres longues.

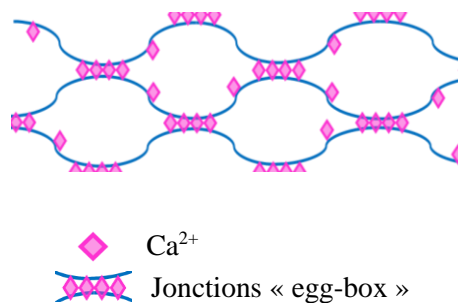
IV. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, on a pu mettre en avant le comportement hybride des matériaux biomimétiques de la paroi végétale. Ce matériau se comporte comme un hydrogel renforcé par des fibres.

La première partie du chapitre s'est intéressée à la caractérisation de matériaux biomimétiques de la paroi, constitués de cellulose et de pectines de degré de méthylation de 52%, dans différents milieux d'hydratation.

Les matériaux sont en partie constitués de cette phase aqueuse qui contrôle le gonflement du gel de pectines. Des paramètres tels que la concentration en ions, leur nature, le volume de réhydratation ou la présence d'un co-soluté influencent son gonflement en raison de la nature polyelectrolyte des pectines. Au-delà du pKa des pectines, c'est-à-dire à pH supérieur à 4,5, le pH n'influence pas les propriétés du matériau.

Les pectines forment un gel en présence de calcium en raison d'interactions physiques assurant la formation de jonctions de type « egg-box ». La réhydratation par une solution à 0,1 mol/L en Ca^{2+} permet de maintenir cette réticulation après plusieurs heures d'immersion. En raison de la force ionique importante de ce milieu, les charges ne participant pas à des jonctions egg-box sont masquées par des contre-ions ce qui favorise d'autant plus le maintien des interactions entre pectines. Cette concentration en calcium n'est peut-être pas similaire à celle d'une paroi végétale mais elle permet cependant d'obtenir des matériaux ayant une teneur en eau équivalente (Albersheim et al., 2011).



La formation du gel pectique est basée sur des interactions physiques. Sa réticulation est donc réversible et la présence d'autres ions dans la phase aqueuse peut moduler le degré de réticulation du gel pectique par échange des espèces ioniques au niveau des jonctions egg-box.

Un co-soluté, ne modifiant pas le taux de réticulation du gel, peut être utilisé pour modifier la pression osmotique de la phase aqueuse et donc le gonflement du gel. Le PEG permet de remplir cette fonction. Cette stratégie est particulièrement utile pour caractériser les propriétés mécaniques en traction de ces gels.

En effet, dans la deuxième partie du chapitre, on a pu observer que les propriétés mécaniques de ces matériaux sont liées à leur taux de gonflement. Ce comportement est classique pour des gels. En revanche, pour ces matériaux, la dépendance du module d'élasticité avec le taux de gonflement est très largement supérieure à ce qui est généralement reporté pour des gels (Dubrovskii et Rakova, 1997). Ces matériaux sont en effet constitués de charges cellulosiques dont la fraction volumique influe sur les propriétés mécaniques.

On s'est aussi intéressé à la variation des propriétés des matériaux biomimétiques avec le degré de réticulation du réseau pectique en modifiant le type de pectines intégrées à la composition initiale. Des pectines faiblement méthylées (DM = 31%) mènent à des matériaux aux propriétés très différentes en raison de l'augmentation du degré de réticulation. Le matériau devient plus rigide et déformable et moins fragile.

Enfin, dans une troisième partie, le rôle de la composition en polysaccharides sur les propriétés des matériaux biomimétiques a été étudié. Le xyloglucane est introduit dans les compositions afin de s'approcher au mieux d'une structure réelle de paroi végétale.

Dans des conditions de réhydratation similaires pour chaque composition, les variations des fractions de pectines (DM =52%) et de xyloglucane ont peu de conséquences sur le gonflement et les propriétés mécaniques. On note tout de même une légère diminution du module d'Young avec l'ajout de xyloglucane, montrant son rôle négligeable dans l'élasticité des matériaux.

C'est principalement la variation de la fraction de MFC qui influence les propriétés des matériaux. Celles-ci agissent en effet comme un renfort fibrillaire à l'hydrogel. Ce comportement a pu être modélisé grâce à la combinaison du modèle d'Halpin-Kardos, décrivant le renfort de fibres courtes, et le modèle de Jones-Marques, traduisant les conséquences de l'enchevêtrement de fibres longues.

En conclusion, tout comme la paroi végétale, les matériaux biomimétiques développés dans ce projet sont des matériaux composites complexes. Leurs propriétés varient en fonction de nombreux paramètres interdépendants. La phase aqueuse contrôle le gonflement et donc influe sur les propriétés mécaniques. Des taux d'hydratation et des modules élastiques d'un ordre de grandeur à ce qui est généralement décrit pour les parois végétales (Bidhendi et Geitmann, 2019) sont obtenus par réhydratation des matériaux dans une solution à 0,1 mol/L de calcium. Les matériaux ont des propriétés qui varient selon les conditions d'hydratation, les structures des pectines ou bien la composition en polysaccharides. La fraction volumique de MFC est un paramètre particulièrement important car en tant qu'objets longs et rigides, elles assurent un rôle de charges renforçant l'hydrogel.

Dans la paroi végétale tous ces paramètres peuvent être également finement modulés par la cellule afin d'adopter des propriétés adaptées à sa croissance. Un des aspects particulièrement étudié actuellement est la modification structurelle des pectines par des enzymes. Le chapitre suivant s'intéresse donc à la modification enzymatique des matériaux biomimétiques.

Chapitre 4 : Activité enzymatique sur matériaux biomimétiques

Les pectines subissent de nombreuses modifications structurales au cours de la croissance de la paroi. Les modifications les plus considérables et les plus étudiées actuellement concernent la réduction de leur degré de méthylation (DM) par l'action d'enzymes méthylestérases (PME) et leur dégradation par des polygalacturonases (PG). Ces deux types d'enzymes constituent de grandes familles multigéniques (Sénéchal et al., 2014). L'étude de leur action sur la paroi végétale est complexe car la coexistence d'un nombre important d'enzymes différentes caractérisant la même réaction permet à la plante d'adopter des mécanismes de compensation. De plus, le rôle du DM sur les propriétés mécaniques de la paroi n'est pas clairement établi, un DM faible (inférieur à 50%) pouvant conduire à la fois à des parois rigides et souples (Bidhendi et Geitmann, 2016). La caractérisation de l'évolution des propriétés des matériaux biomimétiques après réaction avec ces enzymes pourrait apporter un éclairage supplémentaire à ces études et permettre de mieux comprendre les mécanismes d'élongation d'une paroi végétale.

Une première étape consiste à vérifier la capacité d'une enzyme à réagir avec un tel substrat. *In vitro* l'activité des enzymes est déterminée dans des milieux liquides. Dans le cas des parois et des matériaux biomimétiques, le gel pectique n'étant pas complètement soluble, la catalyse est réalisée dans un milieu hétérogène et dense. Ce paramètre peut influencer sur la réactivité et le mode d'action des enzymes.

On s'intéresse ensuite à vérifier l'influence de différents paramètres physico-chimiques, tels que le pH et la concentration des différentes molécules en jeu, sur l'activité d'une enzyme. Ces paramètres peuvent à la fois modifier l'activité enzymatique directement mais aussi via la modification des propriétés du substrat comme son taux de gonflement ou son élasticité initiale (voir chapitre 3).

Dans ces deux premières parties, on utilise une PME fongique (*Aspergillus aculeatus*) qui est une PME de référence et qui permet de comparer les résultats avec la littérature et valider les différentes méthodes d'analyse. Une troisième partie se concentre plus particulièrement sur l'études de PME et de PG issues de végétaux et étudiées sur *Arabidopsis thaliana* par l'équipe BIOPI (université UPJV) dans le cadre de ce projet ANR. Cette partie offre la possibilité de comparer l'application enzymatique sur les végétaux et sur les modèles biomimétiques.

I. Réactivité d'une PME sur film biomimétique

En parallèle des végétaux, les PME sont généralement étudiées sur des pectines solubilisées ou sur des gels peu concentrés. L'étude de la réactivité de PME sur des matériaux contenant de la cellulose en plus des pectines est quasiment absente de la littérature. Seules les études de Bonnin et al. (2015, 2019) se sont intéressées à la différence de processivité d'une PME dans des gels contenant de la cellulose. L'intérêt des matériaux biomimétiques développés et étudiés dans le chapitre précédent est que leur structure et leurs propriétés sont proches d'une paroi végétale. L'activité des enzymes sur ces substrats devrait permettre d'apporter des éléments de compréhension supplémentaires.

Il est dans un premier temps nécessaire de vérifier le comportement d'une PME de référence, la PME d'*Aspergillus aculeatus* (AaPME), sur les matériaux étudiés dans le chapitre 3. Cette PME fongique est commercialisée et son comportement a déjà été décrit dans différents contextes. Christgau *et al.* (1996) l'ont caractérisée en détail : sa masse moléculaire se situe entre 35 kDa et 43 kDa, son pH et sa température d'activité optimum sont de 4,5 et 45°C respectivement. Sur des pectines de pommes de DM initial égal à 75%, son activité spécifique est de 5500 nmol de méthanol libérées par minute et par microgramme de protéine. La présence de sels (MgCl₂, CaCl₂ et NaCl) augmente son activité. Un mode d'action non processif de type « multiple-chain » a été identifié, à la fois à pH acide et basique (4,5 et 8) (Duvetter et al., 2006).

L'activité d'AaPME est d'abord caractérisée classiquement avec des solutions de pectines en évaluant l'évolution du DM. Ces réactions préliminaires permettent d'identifier des effets de AaPME sur les pectines d'agrumes utilisées dans ce projet, constituées d'environ 80% d'homogalacturonanes et de les comparer à la littérature.

Ces résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus après application des enzymes sur les matériaux biomimétiques. Les matériaux sont constitués de 30% de MFC et de 70% de pectines. Les proportions importantes en pectines permettent de caractériser plus précisément les modifications structurales et

l'évolution des propriétés des matériaux. Par simplification, le xyloglucane n'est dans un premier temps pas intégré à la composition. Les réactions enzymatiques sont réalisées à 30°C par immersion de chaque échantillon dans une solution tampon MOPS à pH 6 contenant 0,1 mol/L de Ca²⁺. Ces conditions de pH et de température sont classiques pour l'étude des PME (L'Enfant et al., 2015).

L'évolution des propriétés mécaniques des matériaux après réaction enzymatique est également évaluée et mise en relation avec les modifications structurales.

I.1 Cinétique et modifications structurales

Une enzyme est une protéine agissant comme catalyseur d'une réaction. Étudier la cinétique de cette réaction permet alors de caractériser l'efficacité de l'enzyme. *In planta*, les PME assurent un contrôle fin du DM permettant de moduler les propriétés de la paroi et sa croissance.

I.1.a En solution

Le but de cette partie est de déterminer un comportement de référence de AaPME sur des pectines d'agrumes aux caractéristiques variables. Pour rappel, leurs DM sont :

Tableau 4.1 : DM des pectines utilisées dans ce chapitre.

Pectines	P35	P52
DM (%)	31,1	52,5
Écart-type	5,7	0,8

Généralement, il est observé que les pectines les plus méthylées sont de meilleurs substrats pour les PME. Celles-ci peuvent avoir différents modes d'action en présence de pectines aux motifs d'estérification différents. Cet aspect est évalué pour la déméthylation par AaPME de pectines de DM initial 31% (P35) et 52% (P52).

I.1.a.i Cinétique par dosage du méthanol

Les cinétiques de déméthylation des pectines de DM initial 31% et 52%, à 30°C et en milieu tamponné à pH 6, au cours du temps sont comparées. Une façon rapide de connaître la cinétique de réaction des PME sur des pectines est de suivre la quantité de méthanol libérée par la réaction de déméthylation (Figure 4.2).

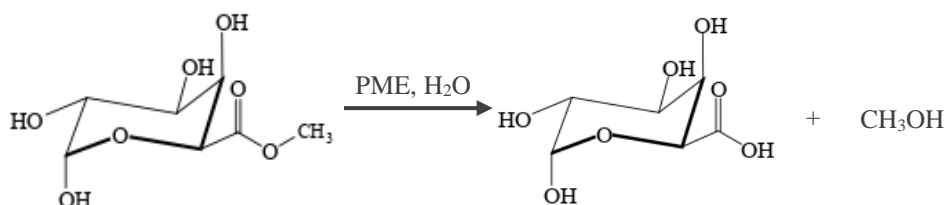


Figure 4.1 : réaction de déméthylation de l'acide galacturonique.

Ce suivi peut être réalisé par dosage colorimétrique (Anthon et Barrett, 2004). Le méthanol prélevé dans le milieu réactif est oxydé à l'aide de l'alcool oxydase dans un milieu complexant. L'absorbance du complexe est mesurée par spectrométrie à 620 nm. Il a été vérifié qu'en présence de l'enzyme dénaturée, le milieu ne contient pas de méthanol.

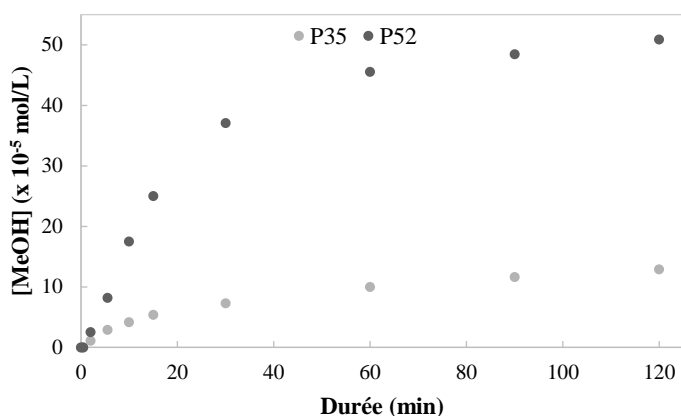


Figure 4.2: suivi de réaction de déméthylation de pectines par dosage du méthanol libéré.
Conditions de réaction : [pectines] = 0,4 g/L, [AaPME] 2 µg/mL, V = 1 mL, pH 6.

La majorité de la réaction se déroule dans la première heure, la vitesse de réaction diminue ensuite considérablement.

AaPME est beaucoup plus réactive avec les pectines P52 car le méthanol est libéré plus rapidement. On peut calculer l'activité spécifique dans ces conditions, correspondant à la vitesse initiale de la réaction. Pour une solution à 0,04% en pectines de DM initial égal à 52%, 1 µg de AaPME libère 7,8 nmol de méthanol par minute. Dans le cas de pectines de DM initialement égal à 31%, une activité de 2,7 nmol/min par µg de protéines est mesurée. La différence de DM conduit ici à une réduction de l'activité par 3. Il est aussi possible qu'un pH apparent plus acide à l'interface des pectines inhibe la PME lorsque le DM devient faible (Pelmont, 1989). Au fur et à mesure de la réaction, le substrat est de moins en moins méthylé et est donc de moins en moins favorable pour AaPME.

Il est reporté dans la littérature des activités largement supérieures mais aussi très variables selon les conditions. Christgau *et al.* (1996) ont mesuré une activité de 5500 nmol/min/µg pour la déméthylation de pectines de pomme de DM initial 75% dans des conditions d'activité optimale (50°C, pH 4,5). Mais une activité de 100 nmol/min/µg a été mesurée par Duvetter *et al.* (2006) pour la déméthylation de pectines d'agrumes (DM = 94%) à 22°C et pH 6. Cette dernière valeur est plus proche de celles obtenues ici car elle est issue d'une réaction réalisée dans des conditions semblables. D'autres paramètres de réaction diffèrent (présence de sels) et peuvent expliquer, en plus des DM initiaux des pectines différents, l'écart d'activité avec notre résultat. Aussi, notre enzyme n'a pas été purifiée et il peut y avoir une erreur sur sa concentration réelle.

AaPME est donc réactive sur les pectines utilisées dans ce projet et dans ces conditions de réaction (30°C, pH 6). Grâce à l'équation :

$$DM(t) = DM_i - \frac{n_{MeOH}(t)}{n_{HG}} \quad [4.1]$$

La cinétique de relargage de méthanol permet de calculer l'évolution du DM des pectines au cours de la réaction (Figure 4.3).

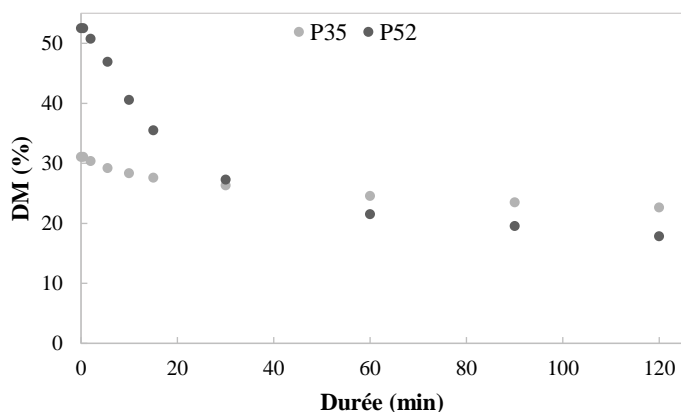


Figure 4.3 : évolution du DM au cours de la réaction.

Le DM est calculé à partir des données de la Figure 4.2 et de l'équation [4.1].

On remarque que la cinétique de réaction n'est pas seulement dépendante du DM des pectines car les pectines de DM initial 52%, ayant atteint un DM d'environ 30%, continuent à être déméthylées plus rapidement que les pectines de DM initial 31%. Une différence de distribution des motifs de méthylation peut également impacter l'affinité de l'enzyme avec le substrat et donc son activité. Ce paramètre sera étudié plus loin dans le chapitre.

La réaction étant plus efficace en partant des pectines méthylées à 52%, ces dernières sont majoritairement étudiées dans ce chapitre.

Aussi, la réaction semble tendre vers un plateau lorsque le DM atteint environ 20% ce qui serait en accord avec la littérature. Il est en effet reporté qu'AaPME laisse 15 à 25% de méthyles après une dégradation prolongée (4-6h) sur des pectines d'agrumes de DM initial égal à 72% (Christgau et al., 1996). Cependant, ici, la durée de réaction de 120 minutes ne permet d'observer de façon certaine le DM minimal pouvant être atteint par déméthylation par AaPME des pectines solubilisées.

1.1.a.ii Déméthylation totale en solution

Pour connaître le DM limite de réactivité de AaPME sur nos substrats, une réaction de 55h est réalisée avec une concentration en AaPME de 5 µg/mL. Les pectines sont ensuite séchées et caractérisées par RMN de l'état solide, ce qui permet de s'affranchir de l'évaporation possible du méthanol lors du dosage.

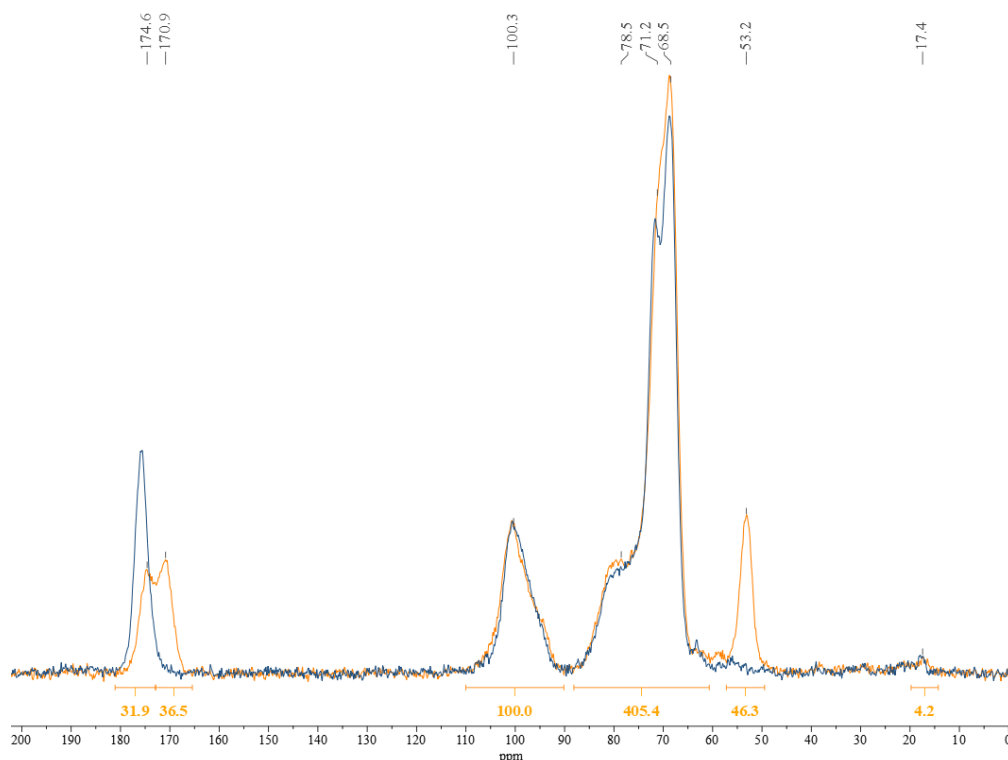


Figure 4.4 : spectres RMN des pectines P52 initiales (orange) et après déméthylation (bleu).
Déméthylation : 55h, [AaPME] = 5 µg/mL.

Les pectines obtenues semblent complètement déméthylées (Figure 4.4). En effet, les pics à 53 ppm et à 171 ppm, respectivement caractéristiques des carbones des méthyles et des méthylesters des pectines, disparaissent après cette réaction prolongée. AaPME est donc réactive sur des homogalacturonanes très peu méthylés et la diminution de DM limite seulement la vitesse de réaction.

Les mêmes méthodes sont ensuite utilisées pour comparer les activités des réactions de AaPME sur des matériaux cellulose/pectines, constitués de 30% de MFC et de 70% de pectines P52.

I.1.b Modification enzymatique des matériaux MFC/P52

Une étude de réaction de AaPME sur des matériaux cellulose/pectines est réalisée dans des conditions expérimentales proches. Avant réaction, chaque échantillon est réhydraté pendant au moins 2h dans une solution tampon à pH 6 contenant 0,1 mol/L de Ca²⁺.

I.1.b.i Cinétique de réaction

Dans cette partie, les réactions sont réalisées sur des matériaux MFC/P52 (R = 0,25) immergés dans 10 mL de solution. La concentration en pectines rapportées au volume total est alors d'environ 2 g/L. Cependant, la concentration en pectines est bien plus élevée dans le matériau et dépend de son taux de gonflement⁸. Une fois l'équilibre de gonflement atteint, 5 µg/mL de AaPME sont ajoutés au milieu de réhydratation de chaque échantillon. L'évolution du DM au cours du temps est suivie à la fois par dosage du méthanol et par RMN des films séchés après réaction (Figure 4.5).

⁸ Pour un échantillon de 30 mg et un taux de gonflement de 5, la concentration en pectines dans le matériau est d'environ 130 g/L.

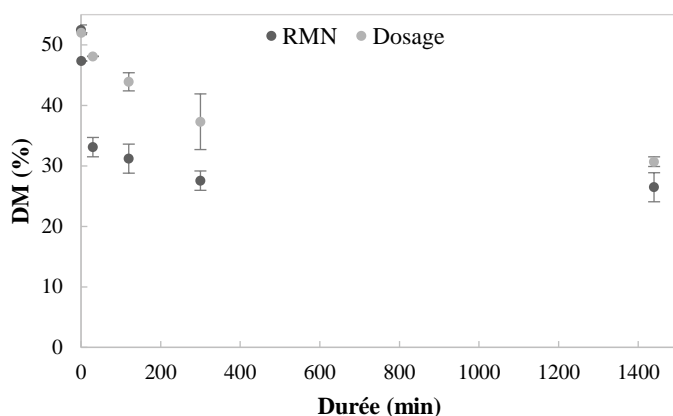


Figure 4.5 : comparaison de l'évolution du DM calculé à partir du dosage du méthanol du milieu réactif ou par analyse RMN des matériaux. Réaction sur matériaux MFC/P52 (30/70), $R = 0,25$.

Comme en solution, la réaction est très rapide pendant les 30 premières minutes et assez rapide jusqu'à 2h mais ralentit considérablement ensuite. La plupart des durées de réaction seront donc fixées à 2h dans le reste du chapitre.

On observe que le calcul du DM à l'aide du dosage du méthanol mène à des valeurs surestimées par rapport à celles mesurées par RMN. Cette erreur peut être due au dosage en lui-même ou à une mauvaise diffusion du méthanol hors du matériau. Le dosage permet donc d'avoir une idée rapide de la cinétique de réaction mais ne permet pas de calculer le DM de façon précise. La caractérisation par RMN sera privilégiée dans la plupart des analyses.

L'activité d'une réaction de déméthylation sur des pectines solubilisées est recalculée à partir du DM obtenu par analyse RMN après une réaction de 2h. Une comparaison est réalisée avec l'activité d'une réaction de 2h sur matériau MFC/P52, avec la même quantité d'enzyme. Cependant les concentrations en AaPME et en pectines diffèrent.

Tableau 4.2 : comparaison des activités de AaPME sur des pectines solubilisées ou sur des matériaux MFC/P52.

	AaPME (µg)	P52 (g/L)	%DM _{2h}	Activité (nmol _{MeOH} /min/µg _{AaPME})
Solution P52	50	10	9,9	5,0
Matériau MFC/P52	50	2	31,2	2,2

Avec une même quantité d'AaPME, l'activité est seulement divisée par 2 lorsqu'elle est réalisée sur un substrat hétérogène par rapport à un substrat solubilisé. Cependant le ratio de PME par rapport aux pectines est en faveur de la réaction sur matériau. On peut donc imaginer une baisse plus importante de l'activité sur les matériaux avec un ratio PME/P52 équivalent.

Une réaction similaire à celle de la partie I.1.a.ii *Déméthylation totale en solution*, permettant de déterminer la limite de réaction, a aussi été réalisée sur les matériaux (5 µg/mL de AaPME et durée de réaction 55h). Le DM obtenu à la fin de la réaction est de 26,9% ($\pm 3,4\%$) soit un DM équivalent à une réaction de 24h.

Contrairement à la réaction en présence de pectines solubilisées, la réaction sur les matériaux atteint donc une limite lorsque les pectines ont un DM moyen autour de 30%. Certains méthylesters peuvent être inaccessibles pour l'enzyme. La diminution du DM entraîne possiblement une augmentation du nombre de jonctions pectines – calcium au cours de la réaction. La densification du réseau pourrait limiter alors la diffusion de l'enzyme.

La réactivité sur des matériaux contenant des pectines P35 a aussi été vérifiée. Contrairement aux matériaux contenant initialement des pectines de DM 52%, les matériaux constitués de pectines P35 ne sont pas modifiés par AaPME (annexe III.1). Ce résultat confirme la limite de réaction sur les matériaux lorsque le DM est d'environ 30%.

I.1.b.ii Effet de la concentration en enzyme

L'influence de la concentration en AaPME sur la réaction sur matériaux MFC/P52 est illustrée dans la Figure 4.6. Des réactions à différentes concentrations en enzymes sont réalisées dans un volume de 0,6 mL pendant 2h. Dans ces conditions les pectines ont alors une concentration (rapportée au volume total) d'environ 35 g/L soit presque 20 fois supérieure à celle des réactions dans 10 mL.

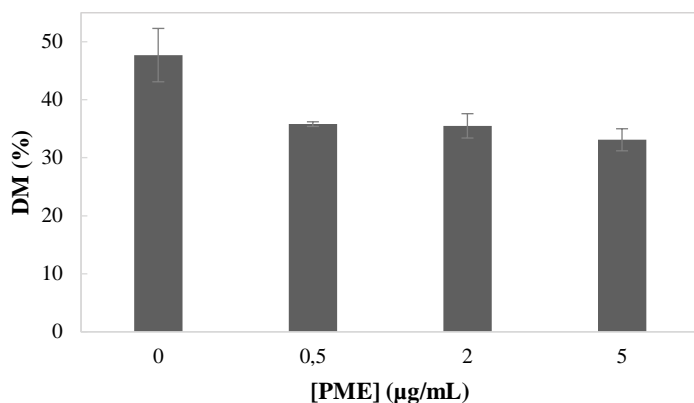


Figure 4.6 : effet de la concentration en AaPME sur l'avancement de la déméthylation.
Réaction : 2h, V = 0,6 mL.

Les DM obtenus au bout de 2h de réaction à différentes concentrations enzymatiques sont peu différents.

La grandeur ΔDM :

$$\Delta DM = \frac{DM_{initial} - DM_{final}}{DM_{initial}} \quad [4.2]$$

est introduite pour traduire l'avancement de réaction plus précisément. Lorsque l'on compare les valeurs de ΔDM en fonction de la concentration en enzyme (Figure 4.7), la réaction avec 5 µg/mL d'AaPME semble légèrement plus efficace que celles réalisées avec des concentrations enzymatiques inférieures.

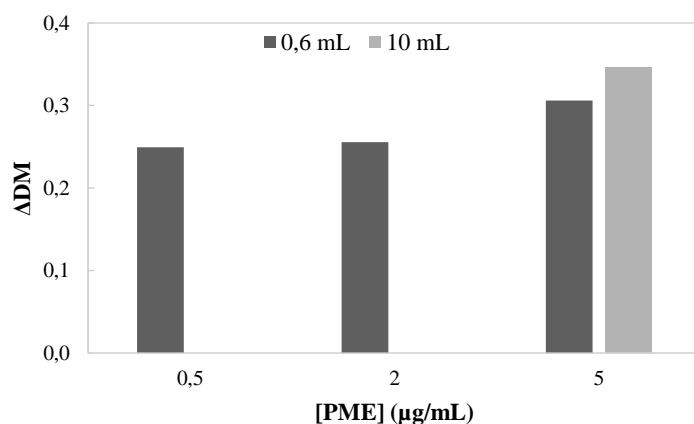


Figure 4.7 : comparaison de l'avancement de la réaction selon la concentration en AaPME.

Aussi, en comparaison, une réaction de même durée réalisée avec une concentration en AaPME de 5µg/mL mais dans un volume de 10 mL mène à une réduction de DM plus importante que la réaction réalisée dans 0,6 mL. Ces résultats mettent en avant que la concentration en enzyme peut jouer un rôle sur l'avancement de la réaction mais que c'est surtout le ratio de la quantité d'enzyme par rapport à la quantité de pectines qui impacte le plus l'avancement de la réaction.

Les comparaisons de réactions réalisées avec le même volume réactionnel sont donc ensuite principalement étudiées. Afin de minimiser la quantité d'enzymes nécessaire, les réactions sont majoritairement réalisées dans 0,6 mL.

Une autre façon de caractériser les modifications structurales des pectines après déméthylation consiste à s'intéresser à la distribution des motifs d'estérification.

I.1.c Comparaison des motifs de déméthylation

Les méthylesters peuvent être distribués de façon aléatoire ou par blocs sur les chaînes pectiques. Cette distribution évolue suite à l'action des PME et est dépendante de leur mode d'action, processif (mécanismes « single-chain » et « multiple-attack ») ou aléatoire (mécanisme « multiple-chain »).

Il est intéressant de connaître les motifs d'estérification car ils peuvent donner aux gels de pectines des propriétés différentes pour un même DM (Ralet et al., 2012; Ström et al., 2007). En effet, les jonctions avec le calcium sont coopératives et des motifs blocs rendent plus probable la présence de suffisamment de sites déméthylés consécutifs pour former ces jonctions.

Le degré de distribution des séquences non-estérifiées des pectines, « degree of blockiness » (DB), est déterminé selon une méthode adaptée de Daas (1999). Les blocs non-estérifiés, c'est-à-dire les zones contenant un enchaînement d'au moins 4 acides galacturoniques, sont spécifiquement dégradés par une endo-polygalacturonase (endo-PG).

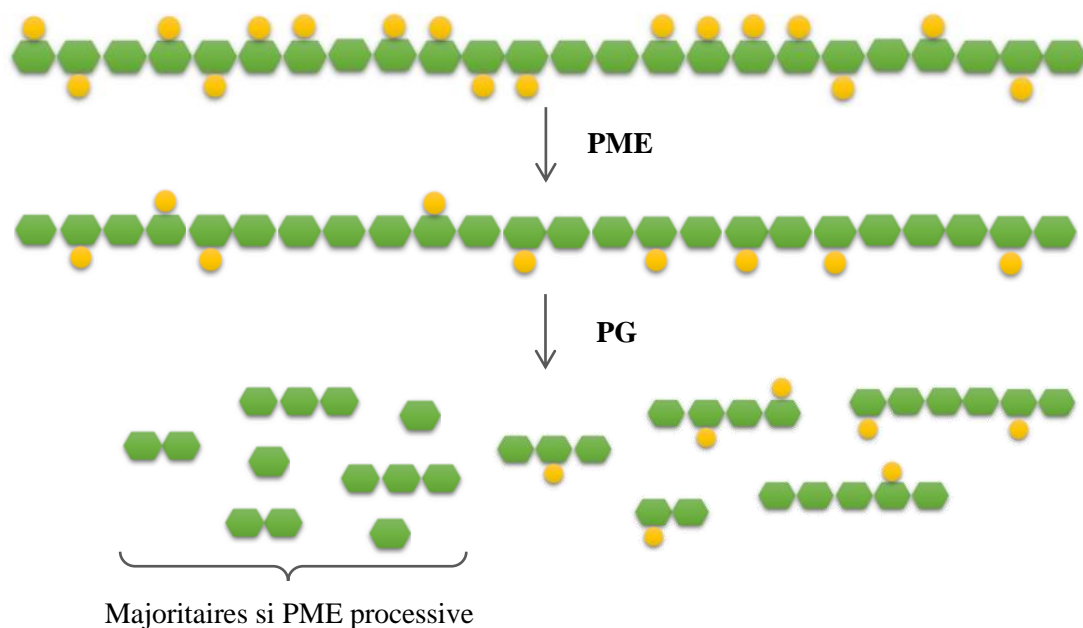


Figure 4.8 : schéma de la dégradation par une endo-PG permettant de déterminer le mode d'action de la PME.

On différencie le DB qui est le ratio des monomères (AGal), dimères (DiAGal) et trimères (TriAGal) d'acides galacturoniques par rapport au total d'acides galacturoniques présents dans les pectines initialement ; et le DB absolu (DB_{abs}) qui considère la quantité des AGal, DiAGal et TriAGal par rapport à la quantité totale de pectines (incluant acides galacturoniques et galacturonanes méthylestérifiés).

Ces grandeurs permettent de différencier des pectines déméthylées de façon processive et formant des motifs blocs ou déméthylées de façon aléatoire. De plus, d'après Ström *et al.* (2007), le module G' de gels pectines – calcium est proportionnel au DB_{abs} des pectines, cette grandeur servira donc lors de l'analyse des propriétés mécaniques des matériaux.

I.1.c.i Validation de la méthode de chromatographie

Les oligosaccharides sont séparés et quantifiés par chromatographie liquide. Une colonne C18 permet de séparer les différents oligomères selon leur polarité. Ils sont ensuite détectés par un DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de lumière). Des standards commerciaux d'acide mono-, di- et trigalacturonique permettent de réaliser une courbe de calibration.

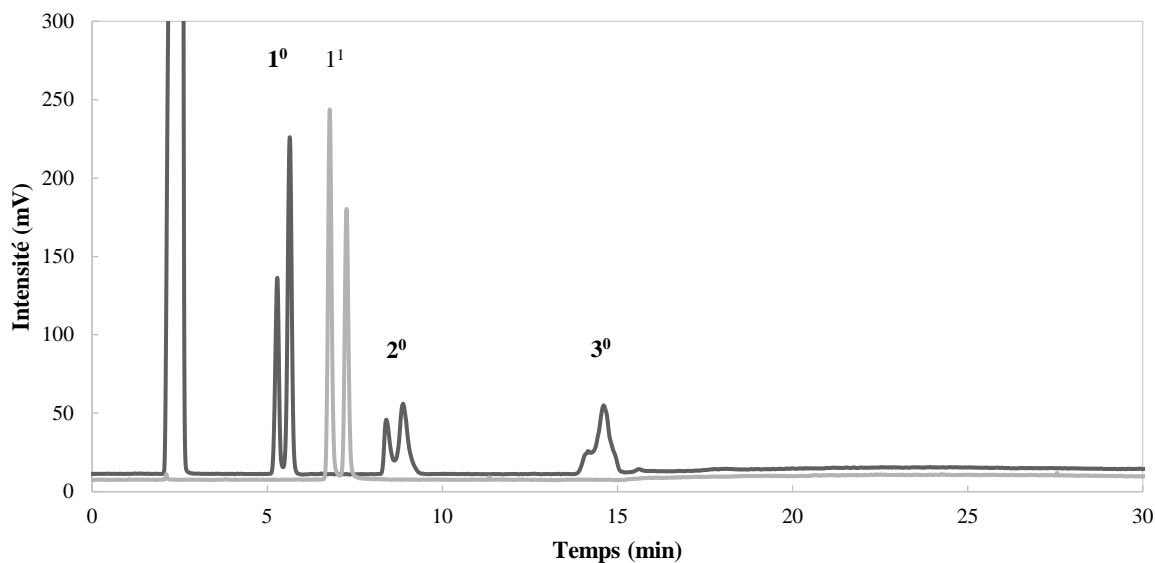


Figure 4.9 : Chromatogramme des standards d'acide monogalacturonique (1^0), d'ester monogalacturonique (1^1), d'acide digalacturonique (2^0) et d'acide trigalacturonique (3^0).

Concentration : 0,5 g/L, notation : DP^{DM} , 1^{er} pic = sel du milieu tampon.

Les oligomères sont élués sous forme d'un double pic correspondant aux deux anomères α et β des sucres (Figure 4.9). Les trois oligomères d'intérêt sont correctement séparés et le standard d'ester galacturonique (1^1) est également élué à un temps différent.

Un échantillon de pectines P52 dégradées par l'endo-PG est analysée par LCMS avec le même programme d'éluion. Cette analyse permet de vérifier dans un échantillon complexe l'absence d'autres molécules aux temps d'éluions d'intérêts. Quelques pics supplémentaires sont également identifiés (voir partie I.1.c.iii *Impact de AaPME sur la distribution des motifs d'estérification*).

La caractérisation des oligomères libérés par les pectines de DM 0% (P0) dégradées par l'endo-PG, montre la présence uniquement des oligomères d'intérêt (1^0 , 2^0 , 3^0) avec une majorité d'acide trigalacturonique (Figure 4.10).

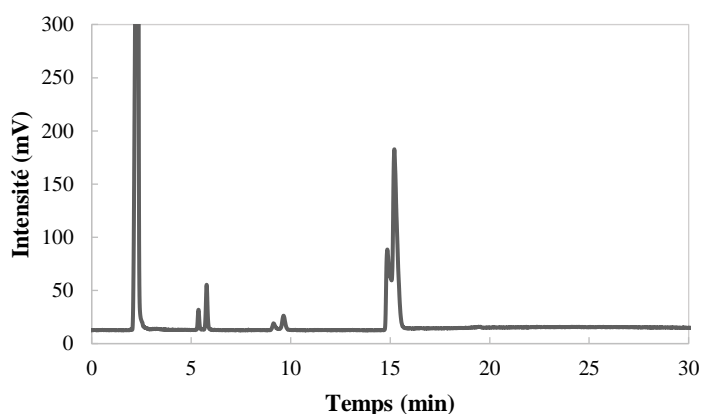


Figure 4.10 : chromatogramme des oligomères issus de la dégradation des P0 par l'ePG.

Le DB calculé est de 115%, il est donc légèrement surestimé. Une imprécision dans la pureté des standards commerciaux peut en être à l'origine. Dans la littérature, une valeur de 90% est obtenu pour l'acide polygalacturonique (PGA) (Tableau 4.3). Cependant, pour ces deux études, une PG différente est utilisée et semble mener à la présence d'oligomères de DP 4, non intégrés au calcul du DB.

La méthode modifiée permet donc de caractériser un DB. Elle n'a cependant pas été testée avec des pectines modèles dont la nature des motifs est connue. Or, dans la littérature, différentes valeurs de DB et DB_{abs} sont obtenues par différentes équipes pour des pectines aux motifs connus (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : références rapportant la caractérisation du DB de pectines aux motifs d'estérification connus. Aléatoire = déméthylation chimique ; bloc = déméthylation par PME de tomate (*ou d'orange). ** séparation par électrophorèse capillaire.

Référence	DM (%)	Motif	DB (%)	DB _{abs} (%)
(Daas et al., 1999)	0	-	88	n.c.
	30	aléatoire	17	n.c.
	52	aléatoire	5	n.c.
	56	bloc	33	n.c.
(Ström et al., 2007) **	30	aléatoire	50	35
	50	aléatoire	25	13
	30	bloc*	95	67
	50	bloc*	91	45
(Fraeye et al., 2010a)	5	-	89	85
	30	aléatoire	17	12
	46	aléatoire	9	5
	27	bloc	30	22
	48	bloc	15	8
(Ralet et al., 2012; Tanhatan-Nasseri et al., 2011)	40	aléatoire	33	20
	56	aléatoire	21	9
	36	bloc*	71	46
	56	bloc*	73	32

Ces différences peuvent être liées à l'origine de l'endo-PG utilisée pour la dégradation (Ström et al., 2007). On peut aussi supposer que l'origine des pectines et leurs caractéristiques initiales ; des différences de préparation des échantillons et des méthodes de séparation des oligomères peuvent mener à des résultats divers. Il semble plus pertinent de comparer la différence de DB entre pectines, pour une même méthode.

1.1.c.ii Distribution des motifs d'estérification des pectines P52 et P35

Les pectines utilisées sont des pectines commerciales. Leurs conditions d'extraction et la façon dont leur DM est contrôlé ne sont pas connues. Il est donc nécessaire de déterminer de quelle manière les méthylesters sont initialement distribués sur ces pectines avant applications de PME.

Les DB et DB_{abs} ont été mesurés après dégradation par l'endo-PG des pectines initiales et de matériaux MFC/Pectines (30/70) n'ayant pas été modifiés par des PME. Pour les deux pectines, P52 et P35, les valeurs de DB diffèrent peu selon que les pectines soient libres ou au sein d'un matériau avec des MFC lors de la dégradation par l'endo-PG (Figure 4.11).

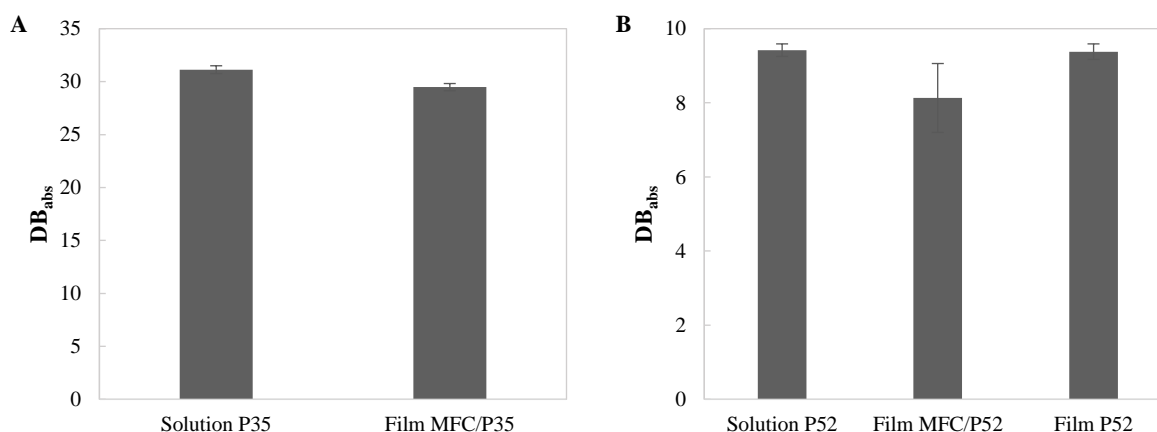


Figure 4.11 : comparaison des DB calculés après dégradation des pectines solubilisées ou des films contenant les pectines P35 (A) ou P52 (B).

La PG semble donc diffuser correctement au sein des matériaux et attaquer l'ensemble des pectines. Les résultats donnés (Tableau 4.4) sont les moyennes des résultats obtenus pour les deux types de substrats.

Tableau 4.4 : valeurs moyennes de DB et DB_{abs} des pectines initiales.

Pectines	DB (%)	DB _{abs} (%)
P35	44,0 ± 1,7	30,3 ± 1,2
P52	17,6 ± 3,0	8,3 ± 1,4

Pour P52, seulement environ 18% des acides galacturoniques non méthylés sont libérés par l'endo-PG, contre environ 44% chez P35. Les valeurs de DB_{abs} traduisent qu'environ un tiers des pectines P35 correspond à des blocs non méthylés contre seulement 8% pour les pectines P52. Il y a donc une différence de degré de « blockiness » entre P35 et P52, P35 contenant plus de blocs non méthylés.

Nos résultats sont comparés à ceux de la littérature (Tableau 4.3). D'après l'étude de Fraeye *et al.* (2010a) qui utilise une méthode de quantification similaire, ces valeurs de DB et DB_{abs} sont représentatives de pectines aux motifs blocs.

I.1.c.iii Impact de AaPME sur la distribution des motifs d'estérification

L'effet de la déméthylation par AaPME sur la distribution des motifs d'estérification est vérifié après modification du matériau MFC/P52 par 5 µg/mL d'AaPME pendant 2h à pH 5.

Le profil d'élution des oligomères issus de la dégradation par l'endo-PG du matériau modifié par AaPME est comparé à celui obtenu pour les pectines initiales (Figure 4.12).

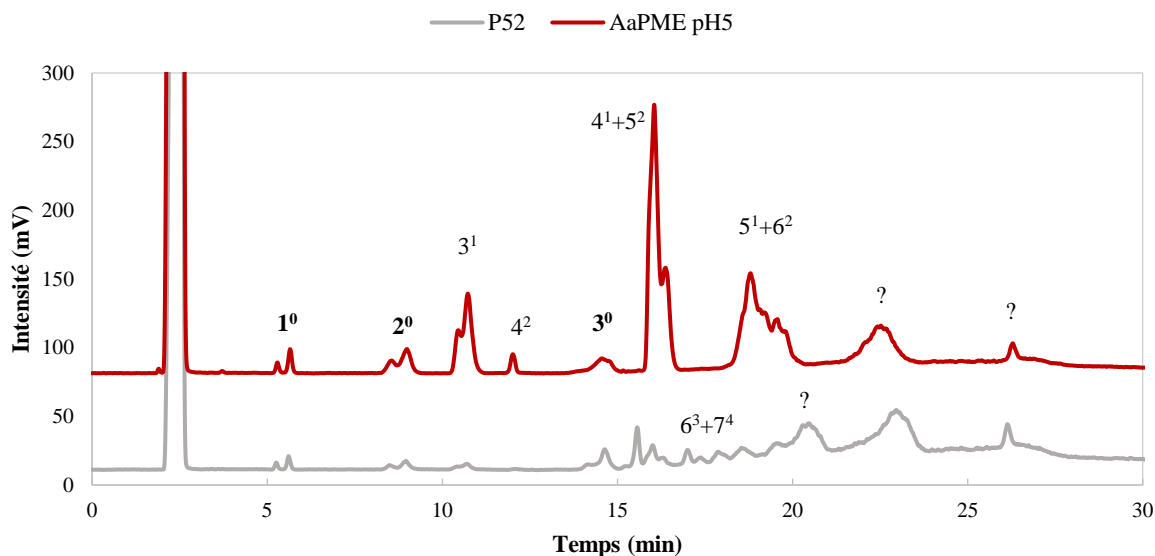


Figure 4.12 : comparaison des profils d'élution des oligomères des pectines initiales (gris) et après modification par AaPME d'un matériau MFC/P52 (rouge).

Après déméthylation par AaPME, les quantités d'oligomères observés s'éloignent de celles obtenues avec les pectines P52 initiales. L'échantillon ayant été déméthylé il contient plus d'acides galacturoniques non méthylés, il n'est donc pas surprenant d'observer que la dégradation par l'endo-PG produise plus d'oligomères.

L'analyse en LCMS réalisée sur l'échantillon P52 initial permet d'identifier quelques pics supplémentaires. L'échantillon issu de la réaction avec AaPME semble contenir beaucoup plus d'oligomères de faibles DP légèrement méthylés (3¹, 4¹/5², 5¹/6²) que l'échantillon initial. Cela pourrait aussi traduire la présence de plusieurs zones des pectines ayant des motifs d'estérification aléatoires, même après modification par AaPME.

Le DB calculé pour l'échantillon modifié par AaPME reste équivalent à celui des pectines non modifiées (Tableau 4.5). Le DB_{abs} augmente légèrement en raison de la modification du DM.

Tableau 4.5 : DB et DB_{abs} calculés à partir des aires du chromatogramme de la Figure 4.12.

	DM (%)	DB (%)	DB_{abs} (%)
P35	31,1	44,0	30,3
P52	47,2	17,6	8,3
MFC/P52 + AaPME	28,5	16,8	12

Le DB reste cependant relativement faible comparé à ceux qui peuvent être observés pour des pectines aux motifs blocs dans la littérature (Tableau 4.3) et par rapport aux pectines commerciales P35.

On peut donc conclure que cette enzyme ne semble pas déméthylater de façon processive les pectines du matériau MFC/P52. Cela est en accord avec ce qui est généralement décrit pour la déméthylation par ce type d'enzyme (fongique) de pectines solubilisées (Sénéchal et al., 2014).

On s'intéresse ensuite aux conséquences de cette modification du DM sur les propriétés des matériaux.

I.2 Conséquences sur les propriétés mécaniques des matériaux

L'activité sur film biomimétique peut aussi être analysée grâce à l'évolution des propriétés du matériau. Il a été montré dans le chapitre 3 que le gonflement et les propriétés mécaniques dépendent du réseau pectique. On s'intéresse donc à l'impact des modifications structurales dues aux réactions enzymatiques sur le gonflement des matériaux MFC/P52 ($R = 0,5$) et leurs propriétés mécaniques.

I.2.a Effets de la concentration et du temps

Des réactions de différentes durées, à différents pH et concentrations en AaPME sont réalisées⁹ et permettent d'obtenir des DM finaux de 27% à 42%.

Les courbes des contraintes en fonction de la déformation, permettant de visualiser l'évolution des propriétés mécaniques, sont représentées pour deux types de séries en Figure 4.13 et en Figure 4.14. La première montre l'évolution des propriétés pour des réactions de durée croissante et une concentration en AaPME fixée à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ et la deuxième montre des réactions de 2h mais pour lesquelles la concentration en AaPME varie.

⁹ Les matériaux sont d'abord réhydratés pendant 15h dans un milieu tampon de 0,6 mL et à 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Les réactions sont réalisées dans ce milieu une fois le gonflement initial ayant atteint l'équilibre. Le taux de gonflement après réaction, q_{final} , est mesuré après équilibrage du matériau dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} pendant plusieurs heures après la fin de la réaction. Les essais de traction permettant de mesurer le module d'Young (E) sont également réalisés suite à cet équilibrage. Le DM est mesuré par analyse RMN des matériaux séchés.

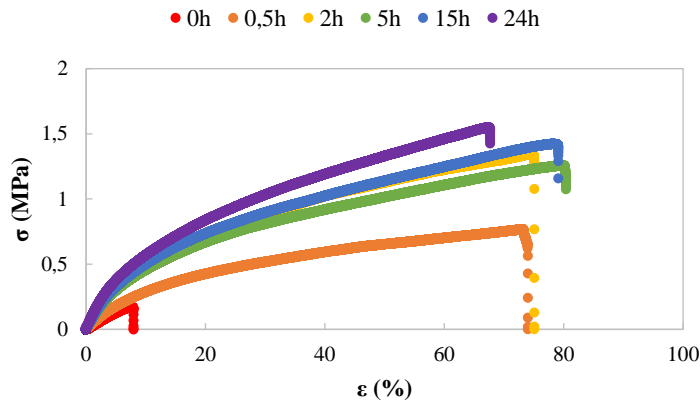


Figure 4.13 : courbes de tractions des matériaux après modification par AaPME de différentes durées.
[AaPME] = 0,5 µg/mL, V = 0,6 mL.

Tableau 4.6 : DM des pectines des matériaux modifiés par AaPME et représentés en Figure 4.13.

durée (h)	DM (%)
0	47,7
0,5	41,9
2	35,8
5	38,3
15	36,9
24	36,7

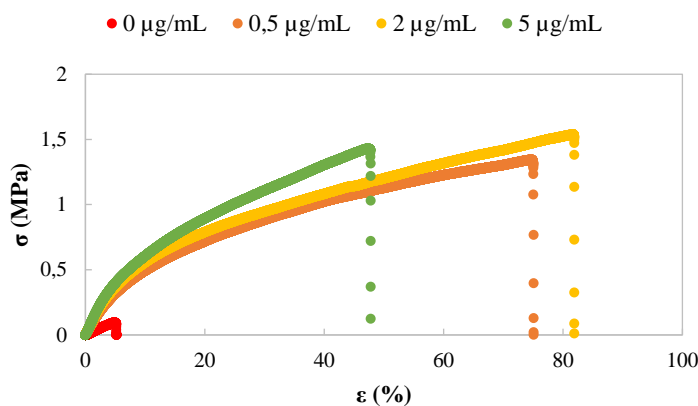


Figure 4.14 : courbes de tractions des matériaux après modification par AaPME à différentes concentration.
Durée de réaction : 2h, V = 0,6 mL.

Tableau 4.7 : DM des pectines des matériaux modifiés par AaPME et représentés en Figure 4.14.

Concentration PME (µg/mL)	DM (%)
0	47,7
0,5	35,8
2	35,5
5	33,1

Ces courbes mettent en avant l'efficacité de la réaction même pour une durée courte ou avec une concentration en enzyme faible. En effet, en présence de PME, on observe une augmentation très significative de l'ensemble des propriétés : module d'élasticité, contrainte et déformation à la rupture. Même une faible diminution du DM permet d'observer des effets importants sur les propriétés mécaniques des matériaux. L'évolution des propriétés avec les différents paramètres de réaction est aussi notable mais moins significative.

La diminution du DM par réaction de AaPME sur les matériaux conduit en théorie une modification du degré de réticulation du gel pectique car la réaction est réalisée dans un milieu riche en Ca^{2+} . La modulation des propriétés mécaniques découle principalement de cette diminution de DM car, comme vu dans le chapitre 3, les paramètres de réhydratation du matériau, tels que la durée d'immersion et le pH, n'ont pas d'influence sur leurs propriétés mécaniques. Le taux de réticulation est également dépendant du motif d'estérification des pectines mais comme observé dans la partie précédente I.1.c.iii, le DB ne semble pas être significativement modifié avec cette enzyme.

Ces réactions ont été répétées et l'ensemble des résultats obtenus est rassemblé dans le Tableau 4.8. Les couleurs permettent de distinguer les séries de réactions réalisées avec différentes concentrations en AaPME et sont ensuite reprises dans les graphes pour nuancer les tendances.

Tableau 4.8 : résumé des conditions de réactions et des propriétés principales des matériaux après modification par AaPME. pH 6 sauf *pH 5 et ** pH 8 ; volume réaction = 0,6 mL.

Conditions de réaction		Résultats				
[AaPME] (µg/mL)	Durée (h)	DM _{final} (%)	ΔDM	q _{final}	E (MPa)	E/E ₀
0	0	47,7 ± 4,6	-	4,2 ± 0,5	2,3 ± 0,4	1,0
0*	0	47,2 ± 5,0	0,01	5,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,6
0,5	0,5	41,9 ± 3,1	0,12	4,8 ± 0,1	4,1 ± 0,4	1,8
0,5	2	35,8 ± 0,4	0,25	4,0 ± 0,4	8,1 ± 0,3	3,5
0,5	2	38,8 ± 1,4	0,19	4,4 ± 0,2	6,2 ± 0,7	2,7
0,5	5	38,3 ± 2,4	0,20	4,8 ± 0,1	7,3 ± 0,3	3,2
0,5*	2	36,1 ± 3,5	0,24	4,0 ± 0,2	7,3 ± 0,4	3,2
0,5**	2	37,0 ± 1,2	0,22	3,6 ± 0,6	5,0 ± 0,4	2,2
0,5	15	37,2 ± 3,8	0,22	3,7 ± 0,5	13,9 ± 0,8	6,1
0,5	15	36,9 ± 3,1	0,23	4,8 ± 0,1	8,7 ± 0,5	3,8
0,5	24	37,0 ± 1,5	0,22	3,2 ± 0,6	15,4 ± 1,4	6,7
0,5	24	36,7 ± 3,4	0,23	4,7 ± 0,1	9,8 ± 0,3	4,2
0,5	2	38,4 ± 1,8	0,19	4,5 ± 0,1	5,5 ± 0,3	2,4
2	2	36,5 ± 2,4	0,23	3,9 ± 0,8	8,8 ± 1,7	3,8
2	2	35,5 ± 2,1	0,26	4,1 ± 0,6	10,6 ± 1,2	4,6
5	2	33,1 ± 1,9	0,31	3,5 ± 0,3	11,3 ± 0,8	4,9
5	2	37,7 ± 4,5	0,21	3,8 ± 0,6	8,8 ± 0,4	3,8
5*	2	28,5 ± 2,8	0,40	4,3 ± 0,3	9,7 ± 1,0	4,2
5**	2	33,6 ± 0,9	0,30	4,9 ± 0,1	6,1 ± 0,2	2,7
5	55	26,9 ± 3,4	0,44	3,3 ± 0,2	29,2 ± 1,1	12,7

Le comportement des matériaux, c'est-à-dire leur gonflement, module et propriétés à la rupture, après modification enzymatique est donc analysé plus en détail dans les parties suivantes. L'évolution des propriétés en fonction des modifications structurales (modification du DM) est commentée.

I.2.b Gonflement

Les taux de gonflement donnés dans le Tableau 4.8 sont représentés en fonction du DM et de ΔDM dans la Figure 4.15.

La mesure du taux de gonflement n'est pas assez précise pour mettre en avant une tendance claire avec la durée de réaction ou la concentration en enzyme. Les valeurs de taux de gonflement obtenues après des réactions de différentes durées et à différentes concentrations en enzyme restent proches des valeurs des échantillons témoins (valeurs en vert).

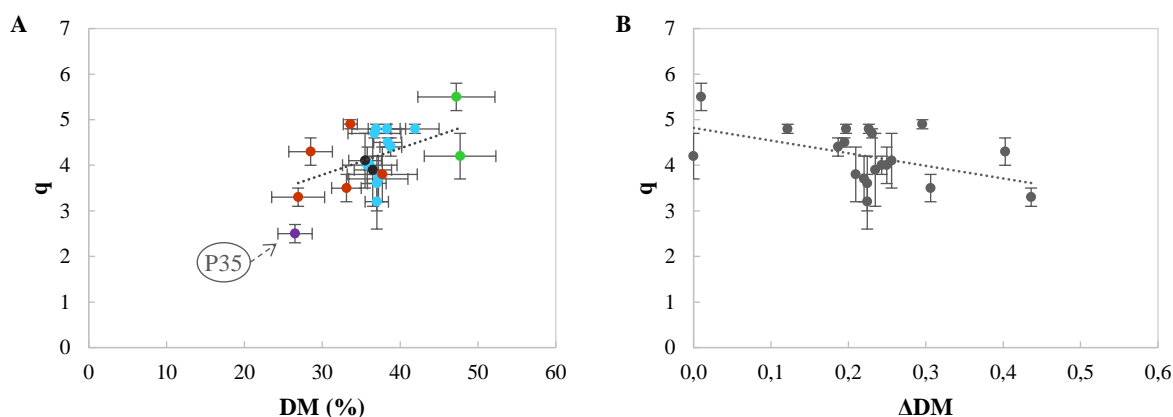


Figure 4.15 : évolution du taux de gonflement q en fonction du DM (A) ou de la modification de DM (B) des pectines.

Le gonflement des matériaux semble peu impacté par la modification de la structure des pectines. On peut quand même noter une légère diminution du taux de gonflement avec la diminution du DM (ou

avec l'avancement de la réaction Δ DM). Cette tendance est en accord avec une augmentation du taux de réticulation du gel pectique dans des conditions physico-chimiques similaires.

De manière intéressante, les matériaux composés de P35 initialement ont un taux de gonflement de 2,5, ce qui semble plus faible que ceux des matériaux dont le DM est équivalent après modification par AaPME. La distribution des méthylesters peut mener à un réseau pectique différent (voir partie I.1.c.iii *Impact de AaPME sur la distribution des motifs d'estérification*) avec un comportement différent. Aussi, les polysaccharides ont peu de mobilité au sein du matériau et les réarrangements moléculaires pouvant mener à un réseau optimal sont limités.

I.2.c Module d'élasticité

Dans le tableau on remarque qu'en revanche le module d'élasticité varie significativement avec la modification du DM. Plus précisément, il augmente avec la diminution du DM (Figure 4.16).

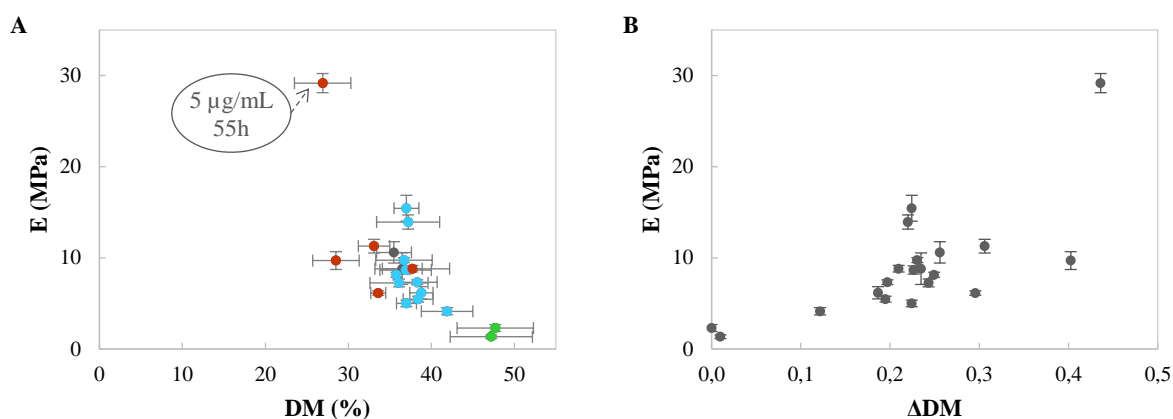


Figure 4.16 : évolution du module d'Young E en fonction du DM (A) ou de la modification de DM (B) des pectines.

Cette évolution est cohérente avec l'augmentation du nombre de sites de réticulation. Cependant, on peut observer qu'un même DM peut mener à des modules différents. Cela peut être lié à la variabilité issue de la fabrication des matériaux.

Lorsque la réaction est maintenue sur une longue durée avec une concentration en PME importante, la différence de DM reste proche de celles obtenues avec des réactions plus courtes. En revanche, le module d'Young mesuré est largement supérieur. Il semble donc qu'à des faibles DM, une petite variation du DM entraîne une modification importante de la densité de réticulation.

Il est à noter aussi que le module des matériaux initialement constitués de pectines de DM 31% (P35) est d'environ 80 MPa. Comme pour le taux de gonflement, cette valeur est largement supérieure à celles mesurées pour des matériaux de DM équivalent obtenu après réaction avec AaPME. Cela peut s'expliquer par l'existence d'une distribution des méthylesters différentes entre les pectines P35 et les pectines P52 déméthylées, à un DM équivalent, avec AaPME.

Ström et al. (2007) se sont intéressés à l'évolution du module de gel pectiques en fonction de leur DM en réalisant des gels avec des pectines déméthylées par des PME de plantes (papaye ou orange) ou par traitement alcalin. Ils observent une relation linéaire entre le logarithme du module de cisaillement des gels de pectines et leur DM mais avec une pente différente selon le type de déméthylation (Figure 4.17). La pente est largement supérieure lorsque les pectines sont déméthylées par traitement chimique menant à des motifs de méthylation aléatoires (Tableau 4.9).

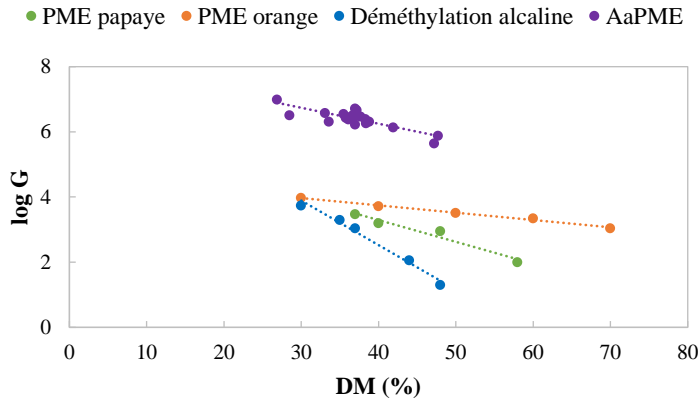


Tableau 4.9 : coefficients des relations linéaires entre $\log G$ et %DM pour chaque série de déméthylation (Figure 4.17).

Déméthylation	coefficient
PME papaye	-0,07
PME orange	-0,02
Alcaline	-0,14
AaPME	-0,05

Figure 4.17 : évolution du module de cisaillement de gel de pectines issues de déméthylations différentes en fonction de leur DM. Données extraites de Ström et al. (2007), sauf AaPME : données calculées à partir du module E (Tableau 4.8).

Le module G de nos matériaux (série AaPME) est comparé à ces données. L'ensemble des modules de nos matériaux est supérieur en raison de la présence de cellulose dans leur composition.

On obtient aussi une relation linéaire du logarithme de G avec le DM, avec une pente proche de celle obtenue pour des séries de pectines déméthylées par des PME de papaye ou d'orange. Ce résultat est étonnant étant donné que cette PME est connue pour avoir un mode d'action aléatoire, qui semble d'ailleurs avoir été confirmé par l'analyse du DB des pectines après modification des matériaux (partie I.1.c.iii *Impact de AaPME sur la distribution des motifs d'estérification*). On s'attendrait donc à ce que l'évolution du module suive plutôt celle obtenue par déméthylation alcaline.

La relation non linéaire entre le module et le DM des pectines ainsi que la variation de la relation selon le type de déméthylation traduisent bien le fait que le taux de réticulation du gel pectique n'est pas proportionnel au DM. La distribution des motifs de méthylation a un rôle important dans la modification du taux de réticulation du gel.

I.2.d Propriétés à la rupture

Comme observé sur les courbes de tractions, les propriétés à la rupture sont aussi modifiées par la création de jonctions calquiques supplémentaires. Les valeurs des contraintes et des déformations à la rupture pour l'ensemble des réactions détaillées dans le Tableau 4.8 sont représentées dans les Figure 4.18 A et B en fonction du DM des pectines après réaction avec AaPME.

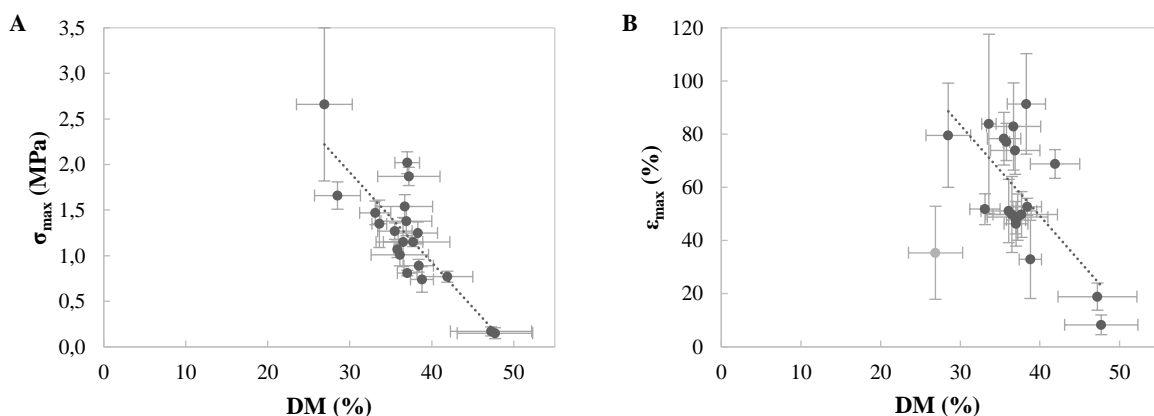


Figure 4.18 : évolution de la contrainte à la rupture (A) et de la déformation à la rupture (B) en fonction du DM des pectines des matériaux modifiés par AaPME.

Malgré la dispersion des résultats liés à la difficulté de mesurer des propriétés à la rupture avec ce type de matériaux, on observe une tendance claire d'augmentation à la fois de la contrainte maximale et de la déformation avec la diminution du DM.

Généralement l'augmentation de la rigidité d'un matériau conduit à diminuer sa capacité d'allongement. Ici, au contraire, l'augmentation du nombre de jonctions dans le réseau pectique rend le matériau plus déformable. Grâce à l'action de AaPME, le matériau biomimétique devient à la fois plus rigide, moins fragile et plus déformable.

I.3 Synthèse partie I

L'application de la PME fongique, AaPME, dans le milieu d'immersion de matériaux biomimétiques MFC/P52 permet de déméthylater les pectines de façon conséquente. En effet, avec seulement 0,5 µg/mL de PME dans le milieu d'immersion, il est possible de diminuer de 25% le DM initial en 2h.

Comparé à une déméthylation de pectines solubilisées, la réaction sur les matériaux est plus lente, et est probablement dépendante de la cinétique de diffusion de l'enzyme au sein du matériau. La réaction atteint également une limite lorsque le DM des pectines diminue jusqu'à une valeur d'environ 30%. Certains méthylesters restent donc inaccessibles au sein du matériau. Il est possible que la diminution du DM, entraînant une augmentation de la réticulation du gel, limite de plus en plus la diffusion de l'enzyme.

On a pu ensuite observer que la déméthylation des pectines du matériau conduit à une modification de ses propriétés. De façon étonnante, le taux de gonflement n'est pas très impacté par l'évolution du DM. En revanche, les propriétés mécaniques en traction évoluent avec le DM. Les propriétés à la rupture sont linéairement dépendantes du DM des pectines modifiées. Le module d'élasticité E semble avoir une relation avec le DM en puissance comme cela a déjà été observé avec des gels de pectines modifiés par des PME végétales (Ström et al., 2007).

Les matériaux dont les pectines sont modifiées jusqu'à un DM d'environ 30% n'atteignent cependant pas les mêmes performances mécaniques que des matériaux constitués initialement de pectines d'un DM équivalent (matériaux MFC/P35). Cela peut en partie s'expliquer par la différence des motifs de déméthylation réalisés par AaPME sur les pectines P52 par rapport aux motifs des pectines P35.

Dans la partie suivante, on s'intéresse plus particulièrement à l'impact des paramètres du milieu d'immersion et de la composition en polysaccharides sur l'activité de AaPME sur les matériaux MFC/P52.

II. Rôle des paramètres physico-chimiques sur la réactivité d'une PME

La paroi végétale est dans un environnement aqueux constitué de nombreux solutés dont la concentration peut varier. La concentration des enzymes dans la paroi est difficile à estimer mais on sait que leur activité peut être régulée, notamment grâce à des protéines inhibitrices. Aussi, le pH et la composition ionique de la paroi sont susceptibles d'évoluer au cours du temps.

On a vu dans le chapitre 3 que certains de ces paramètres peuvent modifier le comportement physico-chimique de la paroi. Mais ils peuvent aussi avoir des conséquences sur la réactivité des enzymes (Catoire et al., 1998; Denès et al., 2000; Hocq et al., 2021). Enfin, il a été suggéré que la présence de cellulose dans un gel de pectines modifierait la réactivité d'une PME (Bonnin et al., 2019). Il est donc intéressant d'étudier l'influence des modifications des ratios de polysaccharides sur l'activité des PME dans des conditions d'hydratation identiques.

II.1 Milieu réactionnel

L'effet de trois paramètres physico-chimiques du milieu réactionnel sur l'activité enzymatique est évalué en mesurant le DM et le module d'élasticité des matériaux après réaction. Des matériaux de composition initiale MFC/P52 (30%/70%) sont utilisés dans cette partie.

Le pH ne modifie pas l'aspect du film qui garde le même gonflement et les mêmes propriétés mécaniques entre pH 5 et pH 8 (voir chapitre 3). Son rôle sur l'activité enzymatique est donc vérifié.

Des réactions réalisées en milieu PEG, afin de limiter le gonflement des matériaux, permettent ensuite de vérifier le rôle de ce paramètre sur la réactivité de AaPME.

Enfin, l'impact de la concentration en calcium sur la réactivité est évalué. De la même façon que pour la pression osmotique, ce paramètre peut modifier à la fois le gonflement du matériau et les propriétés structurales de la protéine.

Après réaction, tous les échantillons sont rééquilibrés dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} afin de mesurer uniquement les propriétés résultant de la réaction enzymatique. Il a été montré dans le chapitre 3 qu'une réhydratation dans une solution de PEG est réversible.

II.1.a Effet du pH

Les enzymes étant composées d'acides aminés, une variation de pH peut conduire à des modifications d'activités des PME. Concernant les matériaux, le pH, entre 5 et 8, ne modifie pas leurs propriétés.

Les réactions sont réalisées en milieu tamponné dans 0,6 mL à 0,1 mol/L en Ca^{2+} pendant 2h. Deux séries avec différentes concentrations en AaPME sont comparées.

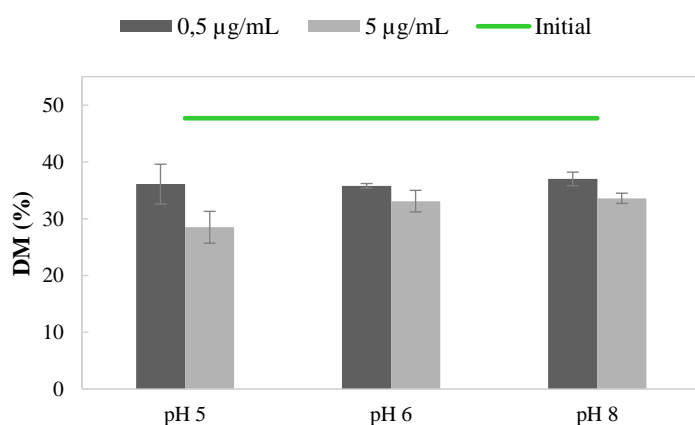


Figure 4.19 : comparaison des DM des pectines après réaction avec AaPME des matériaux MFC/P52 à différents pH. Réaction 2h, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Quelle que soit la concentration en AaPME, le pH ne semble pas modifier significativement le DM mesuré après réaction (Figure 4.19). Cependant, les références citées plus haut reportaient plutôt une différence de processivité en fonction du pH. Deux modes de déméthylation différents pouvant mener aux mêmes DM, il est plus intéressant de comparer la distribution des blocs déméthylés après réaction. Cet aspect sera abordé dans la partie III *Étude d'enzymes de remodelage de différentes origines*.

La constitution des jonctions pectines-calcium est dépendante du motif de distribution des sites non méthylés. À DM équivalent, une distribution bloc est susceptible de former plus de jonctions pectiques qu'une distribution aléatoire. En effet, la formation des jonctions nécessite un enchaînement d'au moins 6 acides galacturoniques non méthylés. Une différence du nombre de jonctions (et donc du degré de réticulation du réseau pectique) résulte en une différence d'élasticité du matériau. La Figure 4.20 représente les modules mesurés après réaction enzymatique à différents pH.

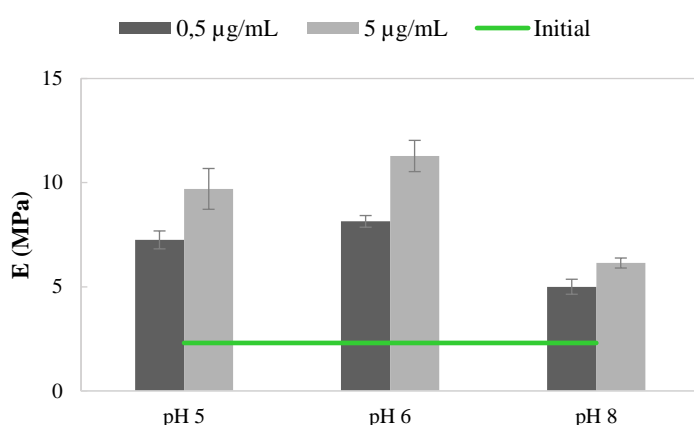


Figure 4.20 : comparaison des modules d'Young E des matériaux MFC/P52 après réaction avec AaPME à différents pH. Réaction 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

On observe que pour les deux réactions à pH 8, le module est inférieur à ceux des réactions à pH 5 et 6. Comme le DM est équivalent, cette réduction peut résulter d'une différence de mode d'action à ce pH. AaPME agirait de façon plus aléatoire à pH 8 qu'à pH 5. L'évaluation des motifs d'estérification, en partie III, pourra permettre de vérifier cette hypothèse.

II.1.b Contrôle du gonflement par la pression osmotique

La pression osmotique, contrôlée par l'ajout d'un soluté, le PEG, contribue à limiter le gonflement du matériau. Un milieu plus contraint pourrait limiter la diffusion de l'enzyme et donc la modification des pectines.

Aussi, la diminution du taux de gonflement conduit à une fraction volumique en MFC plus importante. Or, d'après Bonnin *et al.* (2015), l'augmentation de la concentration en cellulose dans un gel de pectines conduirait à l'accélération de la réaction et à une modification de la processivité.

On s'intéresse donc à évaluer l'effet du gonflement du matériau et de la fraction volumique de MFC sur la réactivité de AaPME avec les matériaux biomimétiques. L'ensemble des conditions de réaction et des résultats sont résumés dans le Tableau 4.10.

Tableau 4.10 : résumé des conditions de réactions comparées dans cette partie et des propriétés des matériaux MFC/P52 mesurées après réaction avec AaPME.

Réaction : 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $pH = 6$, $V = 0,6 \text{ mL}$ sauf * $V = 10 \text{ mL}$.

Conditions de réaction				Résultats		
[AaPME] ($\mu\text{g/mL}$)	PEG (%)	$q_{\text{réaction}}$	Φ_{MFC}	DM _{final} (%)	q_{final}	E (MPa)
0	0	4,2	0,05	47,7 ± 4,6	4,2 ± 0,5	2,3 ± 0,4
0,5	0	4,2	0,05	35,8 ± 0,4	4,0 ± 0,4	8,1 ± 0,3
0,5	10	2,9	0,07	45,8 ± 2,3	3,9 ± 0,0	4,2 ± 0,3
0,5	20	2,2	0,09	44,1 ± 3,2	4,4 ± 0,0	2,6 ± 0,1
0,5	25	1,8	0,11	45,0 ± 1,5	4,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
5*	0	4,2	0,05	31,2 ± 2,4	4,3 ± 0,2	14,9 ± 1,3
5*	10	2,9	0,07	27,5 ± -	3,2 ± 0,1	15,0 ± 2,5

Des DM entre 27% et 46% sont obtenus selon les conditions de réactions. Les taux de gonflement finaux identiques quelques soient les concentrations en PEG utilisées dans le milieu de réaction confirment l'élimination du PEG après rééquilibrage des films dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Comme observé dans la partie I.2. *Conséquences sur les propriétés mécaniques des matériaux*, le taux de gonflement final ne dépend pas notablement du DM final des pectines.

II.1.b.i Variation de la pression osmotique

Les résultats de la première partie du Tableau 4.10 sont d'abord analysés. La concentration massique en PEG du milieu réactionnel varie de 0% à 25% ce qui correspond à des pressions variant d'environ 0 à 0,91 MPa.

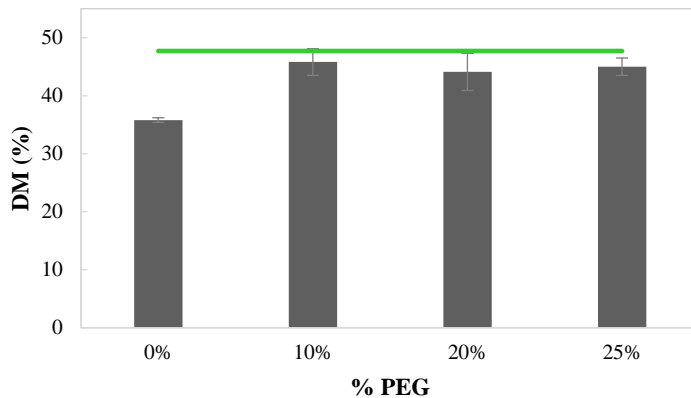


Figure 4.21 : comparaison des DM des pectines après réaction avec AaPME des matériaux MFC/P52 dans des milieux à différentes concentration en PEG. Réaction 2h, $[AaPME] = 0,5 \mu\text{g/mL}$, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Les DM obtenus après réaction en présence de PEG ne sont pas significativement différents du DM de référence (Figure 4.21). La présence de PEG semble donc inhiber la réaction.

Les modules d'élasticité mesurés ne sont également pas significativement différents de celui de référence, aux concentrations en PEG de 20% et 25% dans le milieu réactionnel (Figure 4.22). Cependant, il semble y avoir une modification du module pour la réaction dans 10% de PEG. Il est possible qu'un début de réaction ait lieu mais que la modification de DM soit trop faible pour être mesurée.

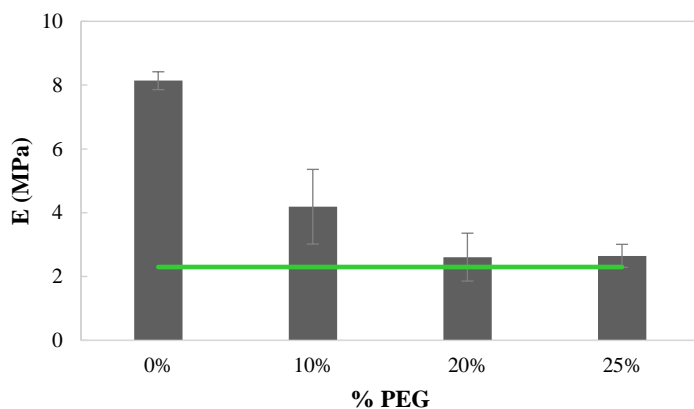


Figure 4.22 : comparaison des modules d'Young E des matériaux MFC/P52 après réaction avec AaPME dans des milieux à différentes concentration en PEG. Réaction 2h, $[AaPME] = 0,5 \mu\text{g/mL}$, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

La présence de PEG, si elle n'inhibe pas la réaction, semble la ralentir fortement. La contraction du réseau pectique en présence de PEG, concentrant les MFC, semble limiter la diffusion de l'enzyme.

La faible concentration enzymatique utilisée pour ces essais n'est sans doute pas adaptée pour évaluer une réaction ralentie. Des réactions avec une concentration supérieure en PME et en présence de 10% de PEG ont aussi été réalisées.

II.1.b.ii Rôle de la concentration enzymatique

Les deux dernières lignes du Tableau 4.10 correspondent à des réactions dans 10 mL et avec une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ en AaPME. Ces résultats sont comparés aux précédents.

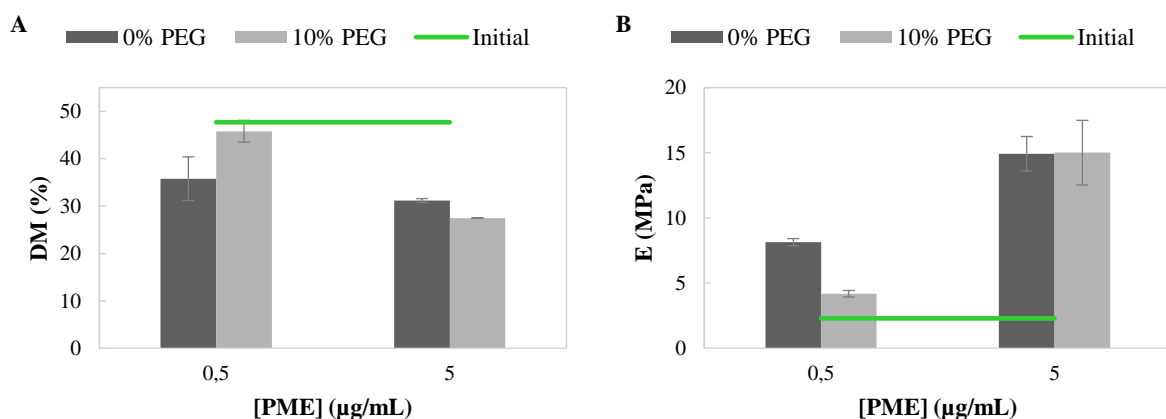


Figure 4.23 : comparaison des DM (A) et modules E (B) selon la concentration en AaPME dans des milieux sans ou avec 10% de PEG. Réaction 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 10 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Contrairement aux réactions à 0,5 $\mu\text{g/mL}$, à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AaPME on observe un DM et un module équivalent lorsque la réaction à lieu en présence de 10% de PEG ou sans PEG. Ces résultats confirment que la présence du PEG et de la pression osmotique modifie seulement la vitesse initiale de réaction.

II.1.c Concentration en calcium

Dans le chapitre 3, il a été montré que le comportement du matériau était dépendant de la concentration ionique du milieu de réhydratation. Son gonflement augmente avec la diminution de la force ionique, à degré de réticulation équivalent.

Faire varier la concentration en calcium dans le milieu de réaction permet de vérifier une fois de plus si le gonflement du matériau modifie l'activité enzymatique. Cependant, les ions peuvent aussi interférer avec des enzymes et modifier leur réactivité (Christgau et al., 1996). Ces derniers ont mesuré une augmentation de l'activité de AaPME en solution de 150% en présence de 0,01 mol/L de Ca^{2+} .

Ces essais ont d'abord été réalisés sans PEG puis dans un milieu contenant 10% de PEG en présence d'une concentration en AaPME plus importante¹⁰. Dans ce milieu, l'amplitude de variation du gonflement est moindre mais la perte de matière est limitée. Les conditions de réaction et les résultats associés sont récapitulés dans le Tableau 4.11.

Tableau 4.11 : résumé des conditions de réactions comparées dans cette partie et des propriétés des matériaux MFC/P52 mesurées après réaction avec AaPME.

Réaction : 2h, pH = 6.

Conditions de réaction					Résultats		
[Ca ²⁺]	PEG (%)	[AaPME] (µg/mL)	q _{réaction}	φ _{MFC}	DM _{final} (%)	q _{final}	E (MPa)
0,01	0	0,5	13,2	0,02	34,2 ± 10,4	-	-
0,05	0	0,5	4,9	0,04	36,3 ± 2,8	-	-
0,1	0	0,5	4,2	0,05	35,8 ± 0,4	4,0 ± 0,4	8,1 ± 0,3
0,01	10	5	3,9	0,05	23,2 ± -	3,7 ± 0,1	11,6 ± 2,0
0,05	10	5	3,3	0,06	27,9 ± -	3,3 ± 0,1	12,1 ± 1,8
0,1	10	5	2,9	0,06	27,5 ± -	3,2 ± 0,1	15,0 ± 2,5

La Figure 4.24 permet de comparer l'évolution du DM en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de réaction. Il semble que la réduction du DM n'est pas dépendante de la concentration en calcium. Dans cette gamme de concentration, de 0,01 mol/L à 0,1 mol/L, l'activité de AaPME n'est pas impactée contrairement à ce qui a été mesuré en solution par Christgau et al. (1996).

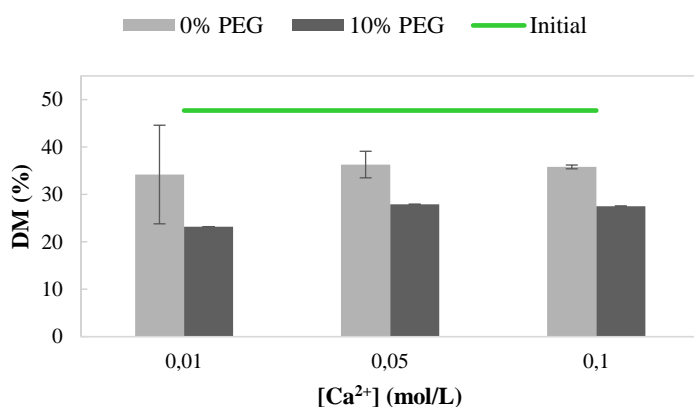


Figure 4.24 : comparaison des DM des pectines après réaction avec AaPME des matériaux MFC/P52 dans des milieux à différentes concentration en Ca²⁺.

Réaction 2h. 0% PEG : [AaPME] = 0,5 µg/mL, V = 0,6 mL. 10% PEG : [AaPME] = 5 µg/mL, V = 10 mL.

Ligne verte = matériau non modifié.

Seules les propriétés mécaniques de la série de réactions réalisée dans le milieu à 10% de PEG sont analysées en raison des pertes de matières plus importantes dans les milieux de réaction sans PEG (diminution importante du module).

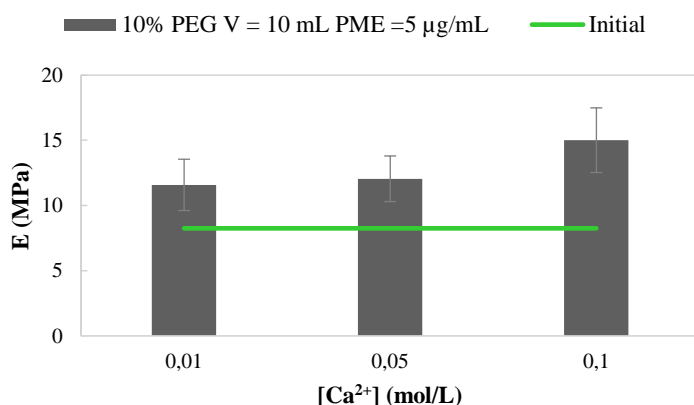


Figure 4.25 : comparaison des modules E des matériaux MFC/P52 après réaction avec AaPME dans des milieux à différentes concentration en Ca²⁺.

Réaction 2h, [AaPME] = 5 µg/mL, V = 10 mL. Ligne verte = matériau non modifié.

¹⁰ Les échantillons sont rééquilibrés après réaction dans 0,1 mol/L de Ca²⁺ pour comparer uniquement des évolutions de propriétés liées aux réactions enzymatiques.

Dans tous les cas le module d'élasticité après réaction est supérieur à celui du témoin négatif. La diminution de la concentration en calcium conduit à une légère diminution de module. Les origines possibles de cette diminution peuvent être la perte de matières ou une réaction enzymatique légèrement moins efficace et non détectable au niveau du DM.

Globalement, la concentration ionique et l'augmentation du gonflement du matériau ne semblent pas avoir d'effet sur la réactivité de l'enzyme. Aussi la diminution de la fraction volumique de MFC ne semble pas modifier la réactivité. Il est possible que plusieurs facteurs se compensent. Une autre hypothèse est qu'à partir d'un certain pallier de taux de gonflement et/ou de fraction volumique de MFC, ces paramètres n'influencent plus la diffusion de l'enzyme dans le matériau.

II.2 Composition du matériau

Il a été suggéré dans l'étude de Bonnin et al. (2015) que l'activité de AaPME est modifiée selon la composition de gels pectines/cellulose. Ils ont observé une augmentation de la cinétique et un mode d'action plus processif lorsque la concentration de MFC dans les gels passe de 0% à 1,5%. Cependant, l'impact éventuel du xyloglucane sur la réactivité des PME n'a pas été évalué.

Aussi il a été observé dans la partie précédente que la réduction du taux de gonflement semble ralentir l'activité enzymatique. Cela pourrait être relié à une densification du réseau pecto-cellulosique. Évaluer l'impact de la variation de la fraction volumique de MFC sur la réactivité de AaPME pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Pour comparer l'effet de la composition en polysaccharides des matériaux biomimétiques, 4 compositions différentes ont été mises en présence de 0,5 µg/mL de AaPME pendant 2h à pH 6. Les évolutions du DM et des propriétés mécaniques après réactions sont analysées. Les différences de réactivité sont mises en relation avec la composition des matériaux.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 4.12. Les proportions de chaque polysaccharide sont données sous la forme %MFC/%P52/%XG. Le DM de la dernière composition ne peut pas être caractérisé par RMN de l'état solide car les proportions de pectines sont trop faibles.

Tableau 4.12 : résumé des propriétés initiales des matériaux de différentes compositions et après réaction avec AaPME. Réaction : 2h, [AaPME]= 0,5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, pH = 6.

Conditions initiales			Résultats				
Composition MFC/P52/XG	Q _{initial}	Φ _{MFC}	DM _{final} (%)	Q _{final}	E _{initial} (MPa)	E _{final} (MPa)	E _f /E _i
30/70/0	4,3 ± 0,0	0,046	35,8 ± 0,4	4,0 ± 0,4	1,9 ± 0,1	8,1 ± 0,3	4,2
30/67/3	4,7 ± 0,1	0,042	27,3 ± 0,1	4,6 ± 0,1	1,6 ± 0,3	3,9 ± 3,9	2,5
60/34/6	3,8 ± 0,0	0,104	21,9 ± 0,2	3,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1	6,7 ± 0,4	2,1
83,2/8,4/8,4	2,6 ± 0,1	0,210	-	2,6 ± 0,1	15,4 ± 1,4	19,5 ± 0,5	1,3

On remarque encore une fois que le taux de gonflement est très peu ou pas du tout modifié par la réaction enzymatique et la réduction du DM.

Comme vu dans le chapitre 3, le module d'élasticité est fortement dépendant des proportions de MFC dans le matériau. Le module obtenu après réaction est donc normalisé par le module du matériau avant réaction afin de comparer l'impact des réactions enzymatiques sur les propriétés mécaniques.

II.2.a Modifications structurales

On s'intéresse dans un premier temps à comparer l'évolution du DM selon la composition du matériau.

II.2.a.i Effet de l'introduction de xyloglucane à la composition

Pour vérifier si la présence de xyloglucane peut avoir un impact sur la réactivité de AaPME, des réactions sur des compositions avec et sans XG mais avec des quantités proches de pectines (30/70/0 et 30/67/3) sont réalisées.

Dans le Tableau 4.12, on peut observer que malgré une très faible différence de gonflement et de fraction volumique de MFC dans le matériau, la réaction semble plus efficace sur le matériau contenant du xyloglucane car la diminution du DM est plus importante.

II.2.a.ii Effet de la modification du taux de MFC

Plus globalement, si on analyse les DM des compositions après réaction avec la même quantité d'AaPME, on remarque qu'il diminue davantage lorsque le ratio de pectines diminue (et le ratio de MFC augmente).

Il est possible que comme pour l'hypothèse issue de l'étude de Bonnin *et al.* (2015), l'augmentation du taux de cellulose dans le matériau favorise la réaction. Mais cela peut également résulter du fait qu'à quantité de PME constante, le ratio de PME par rapport aux pectines augmente lorsque ce dernier diminue, ce qui pourrait modifier la cinétique de réaction. Cette hypothèse est vérifiée dans le paragraphe suivant.

II.2.a.iii Réaction à ratio PME/pectines constant

Des réactions sur différents matériaux ont donc été réalisées en maintenant un ratio de la concentration en PME par rapport à la concentration de pectines constant.

Tableau 4.13 : DM et taux de gonflement de matériaux de compositions différentes modifiés par AaPME avec un ratio PME/pectines identique pour chaque réaction.
Réaction : 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $pH = 6$.

Composition MFC/P52/XG	DM _{final} (%)	q _{final}
0/100/0	33,2	5,1
50/45/5	32,7	3,9
60/34/6	33,4	3,7
70/23/7	24,3	3,1

Le DM semble être dans ces conditions, et pour les trois premières compositions, indépendant du ratio des polysaccharides. Le DM est équivalent également pour des matériaux dont le taux de gonflement est significativement différent : celui constitué uniquement de pectines (0/100/0) et ceux en contenant 34% (60/34/6) ou 45% (50/45/5). Ces résultats sont comparés, en fonction du ratio de pectines ou de la fraction volumique de MFC, à ceux obtenus avec une concentration en AaPME constante.

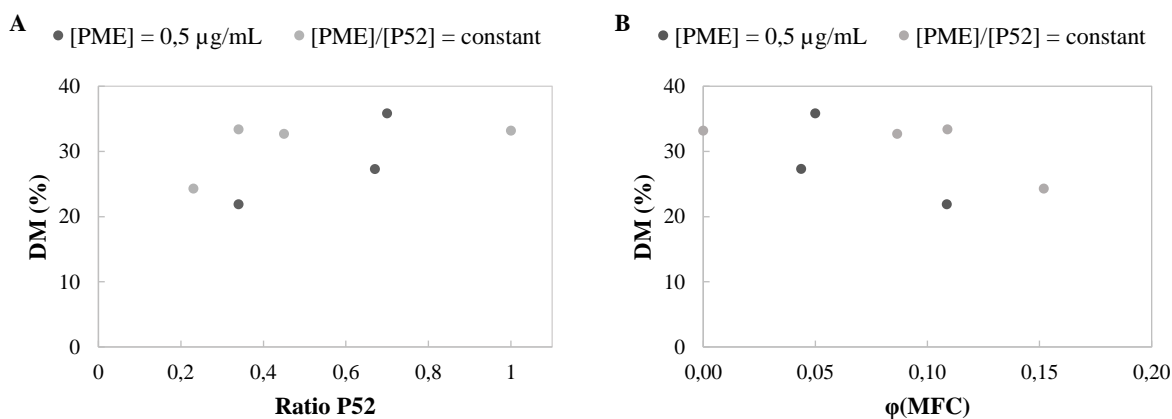


Figure 4.26 : comparaison de l'évolution du DM avec la composition en pectines (A) ou en MFC (B) des matériaux après modification par AaPME, soit à concentration en enzyme constante ou à ratio enzyme/pectines constant.
Réaction : 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $pH = 6$.

Il semblerait donc que la réactivité de AaPME soit indépendante du ratio des polysaccharides dans la composition. Mais la plus forte diminution de DM pour la composition contenant la plus forte proportion de MFC (70/23/7) montre qu'il serait nécessaire de vérifier cette conclusion avec plus de compositions différentes.

On peut également s'intéresser à l'évolution des propriétés mécaniques des matériaux après réactions pour vérifier les différentes hypothèses avancées avec l'analyse de l'évolution du DM.

II.2.b Modification des propriétés mécaniques

Seuls les matériaux du Tableau 4.12, issus des réactions à concentration en AaPME constante, ont été testés par essai de traction. Les courbes de tractions représentatives des matériaux avant et après réactions sont données en Figure 4.27.

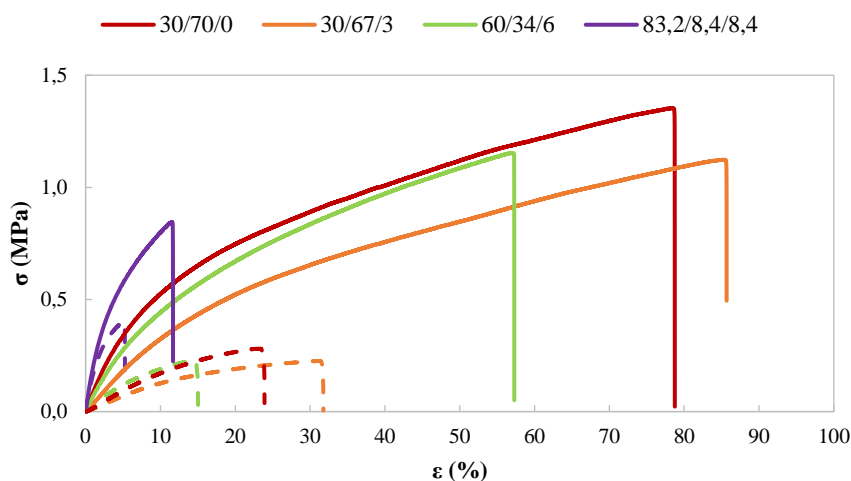


Figure 4.27 : courbes de traction des matériaux avant (tiret) et après modification par AaPME (trait plein).
Réaction : 2h, [AaPME] = 0,5 $\mu\text{g/mL}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH = 6.

L'ensemble des propriétés mécaniques des matériaux de chaque composition augmentent après réaction enzymatique. Cependant, en s'intéressant plus particulièrement au rapport E_f/E_i , on remarque qu'une diminution du DM plus considérable n'engendre pas un accroissement du module plus important, lorsque le ratio de pectines diminue.

On peut aussi comparer les deux compositions ayant des ratios en polysaccharides proches, 30/70/0 et 30/67/3. Le module initial des deux matériaux est proche mais le module final est plus faible pour la composition contenant du xyloglucane. Or, d'après les analyses de DM, ce matériau devrait former plus de nouveaux sites de jonction calcique, après modification par AaPME, que le matériau ne contenant pas de xyloglucane. Il est possible que le XG et les MFC limite la formation de nouvelles jonctions.

II.3 Synthèse partie II

Dans cette partie, on s'est d'abord intéressé aux conséquences que pouvaient avoir les paramètres d'immersion sur l'activité de AaPME.

Il semble y avoir peu d'effet du pH sur l'activité d'AaPME lorsqu'on compare l'évolution du DM. On peut cependant noter une diminution du module après modification à pH 8, comparé aux matériaux modifiés à des pH plus acides. AaPME peut être moins réactive ou mener à des motifs d'estérification différents à pH 8.

Lorsqu'on réduit le gonflement du matériau par pression osmotique dans le milieu d'immersion constitué de PEG, on observe un ralentissement important de la cinétique de réaction. La diffusion de l'enzyme est très probablement ralentie par ce phénomène.

La concentration en calcium du milieu d'immersion modifie également le gonflement du matériau. Lorsque la concentration en calcium diminue, le matériau gonfle plus. Ce phénomène ne semble pas favoriser l'activité d'AaPME. Sur des pectines solubilisées, AaPME est plus active en présence de sels ((Christgau et al., 1996). Il est donc possible que la diminution de la concentration en calcium diminue son activité et que ce phénomène soit compensé par une meilleure diffusion de l'enzyme dans le

matériau. Mais il est aussi possible qu'au-dessus d'un gonflement limite, la diffusion de l'enzyme dans le matériau ne soit pas améliorée.

Globalement, le fait que les pectines soient complexées par le calcium a plus de conséquences sur l'activité d'AaPME que les paramètres physico-chimiques du milieu de réhydratation.

Enfin, l'impact de la composition en polysaccharide du matériau sur la modification par AaPME a été évaluée. L'enzyme est active sur des compositions allant de 8% à 100% de pectines P52 et donc sur des matériaux contenant une fraction importante de cellulose.

Pour une même concentration en PME, on observe des évolutions de DM et de propriétés mécaniques différentes selon la composition. Il semblerait cependant qu'avec un ratio de PME par pectines équivalent entre différentes compositions, le DM obtenu après 2h soit identique.

Dans la partie suivante, on s'intéresse à la modification des matériaux par d'autres PME pouvant conduire à des modifications structurales différentes. L'effet d'enzymes de dépolymérisation des pectines, les PG, est également étudié.

III. Étude d'enzymes de remodelage de différentes origines

Pour vérifier la réponse des matériaux biomimétiques au stimulus enzymatique, seule l'action de la PME d'*Aspergillus aculeatus* a été étudiée en détails dans les deux premières parties. Dans cette dernière partie, on s'intéresse à l'action d'enzymes fournies par le laboratoire BIOPI (Biologie des plantes et innovation), partenaire de ce projet ANR.

Des PME ayant des modes d'actions différents en solution sont appliquées sur les matériaux biomimétiques. Les structures et propriétés mécaniques de ces derniers sont ensuite caractérisées et comparées.

La réactivité de polygalacturonases (PG) sur les films biomimétiques est également étudiée. L'équipe du BIOPI s'intéresse aux conséquences sur la croissance de plants d'*Arabidopsis thaliana* lors de l'application de PG dans le milieu de culture. Les résultats sur matériaux biomimétiques seront donc mis en parallèle avec les phénotypes observés sur les végétaux.

III.1 PME processives

Les PME fongiques peuvent avoir un mode d'action différent par rapport aux PME des plantes (Salas-Tovar et al., 2017). Les PME fongiques, considérées acides, déméthyleraient les pectines de façon aléatoire alors que les PME végétales basiques déméthyleraient les pectines par blocs.

Réaliser la comparaison de réactivité de différentes PME sur les matériaux biomimétiques pourrait permettre de vérifier ces hypothèses issues de dégradation de pectines en solution. De plus, la modification des matériaux selon différents mode d'action enzymatique permet d'obtenir des matériaux avec des propriétés mécaniques différentes.

Deux PME, fournies par le laboratoire BIOPI, sont utilisées dans cette partie. La première est issue du champignon *Verticillium dahliae* (VdPME) mais l'équipe BIOPI a récemment montré que son mode d'action était processif malgré son origine fongique (Safran et al., 2021). Elle a une masse moléculaire d'environ 39 kDa. Son activité spécifique a été mesurée à environ 90 nmol_{MeOH}/min/μg. Le pH et la température optimum d'activité, avec des pectines dont le DM est compris entre 55% et 70%, sont 6 et 40°C respectivement. Son activité n'est pas améliorée en présence de sels contrairement à AaPME.

La seconde, PME *citrus*, est une PME issue d'agrumes et de masse moléculaire environ égale à 34 kDa. Elle est active sur des pectines de DM 50%, à des pH compris entre 5 et 9 et à des températures entre 30°C et 50°C. Son activité n'est pas améliorée en présence de sels (Savary et al., 2002). Son mode d'action varie selon le pH car il a été montré qu'elle produisait de plus longs blocs déméthylés à pH 7,5 qu'à pH 4,5 (Cameron et al., 2008).

L'activité des trois enzymes a été comparée par une méthode de diffusion sur gel de pectines de DM = 70% (BIOPI). À quantité de protéine égale, AaPME est plus active que les deux autres à pH 5 et moins active à pH 7,6. VdPME et PME *citrus* ont des activités équivalentes.

III.1.a Activité enzymatique

On s'intéresse dans un premier temps à comparer avec AaPME la réactivité des deux PME processives sur les matériaux biomimétiques. Des réactions de 2h sont réalisées dans 0,6 mL de milieu tamponné à quantité égale de protéines (5 μg/mL) sur des matériaux MFC/P52.

III.1.a.i Modification du DM sur matériaux MFC/P52

L'évolution du DM des matériaux MFC/P52 en présence des différentes PME est analysée par RMN (Figure 4.28).

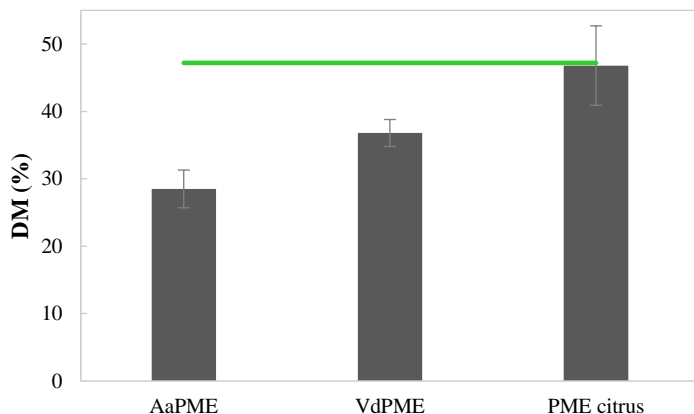


Figure 4.28 : comparaison des DM des pectines des matériaux MFC/P52 après réaction avec différentes PME.
 Réaction : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, pH = 5, V = 0,6 mL.
 Ligne verte = matériau non modifié.

AaPME est la plus réactive des 3 enzymes. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature, son activité spécifique étant aussi plus importante, et avec les observations de tests par diffusion sur gel.

VdPME est également réactive sur les matériaux. En revanche, il semble que l'activité de PME *citrus* soit inhibée dans ces conditions car le DM n'a pas évolué après 2h de réaction. Des durées de réaction plus longues pourraient permettre de vérifier si l'activité est complètement inhibée par le substrat ou si la cinétique est fortement ralentie en raison d'une difficulté pour cette enzyme à diffuser dans le matériau, qui ne serait pas liée à sa taille.

III.1.a.ii Influence du pH sur la réactivité

Dans la partie II de ce chapitre, il a été observé que la diminution du DM après réaction de AaPME sur des matériaux MFC/P52 n'était pas impactée par le pH de la réaction. Cependant, les mesures d'activité par gel diffusion réalisées au préalable (BIOPI) indiquent une activité supérieure à pH 5 par rapport à pH 7,6.

Pour VdPME et PME *citrus*, les activités observées par gel diffusion semblent au contraire supérieures à pH 7,6 qu'à pH 5. On vérifie dans cette partie l'impact du pH sur la réactivité de VdPME et PME *citrus* sur des matériaux MFC/P52.

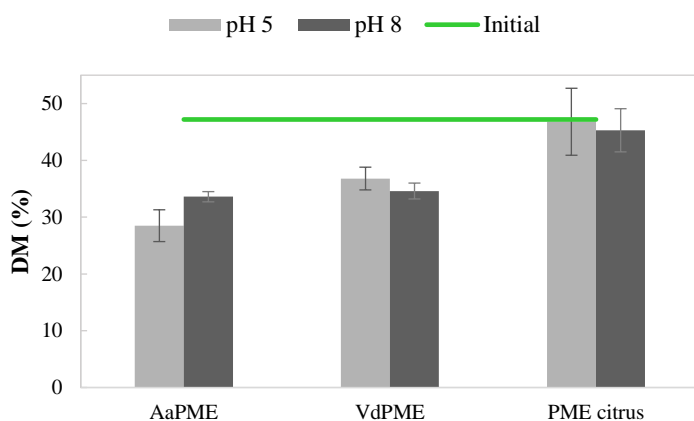


Figure 4.29 : comparaison des DM des pectines des matériaux MFC/P52 après réaction avec différentes PME à pH 5 et à pH 8.
 Réaction : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, V = 0,6 mL.
 Ligne verte = non modifié (pH = 5).

De la même façon que pour AaPME, le pH ne semble pas avoir un impact très significatif sur la diminution du DM après réactions des enzymes sur les matériaux. AaPME semble légèrement plus réactive à pH 5 qu'à pH 8 et inversement pour VdPME, ce qui est en accord avec les activités observées par gel diffusion.

III.1.b Distribution des motifs d'estérification (DB)

Les matériaux issus des différentes réactions des PME sont caractérisés pour calculer le DB des pectines et le comparer au DB initial. Un rappel des DM obtenus après ces réactions est donné dans le Tableau 4.14.

Tableau 4.14 : rappel des DM après réaction avec différentes PME à pH 5 et à pH 8.
Réaction : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, V = 0,6 mL.

Enzyme	pH	DM (%)
Contrôle	5	47,2
AaPME	5	28,5
VdPME	5	36,8
PME citrus	5	46,8
AaPME	8	33,6
VdPME	8	34,6
PME citrus	8	45,3

III.1.b.i Comparaison des profils d'élutions

L'ensemble du profil d'élution de chaque échantillon est d'abord analysé. Ces profils sont issus des dégradations par endo-PG d'une même concentration initiale en matériau MFC/Pectines. On compare les profils des échantillons issus des réactions à pH 5 avec celui des pectines initiales (P52, gris) (Figure 4.30).

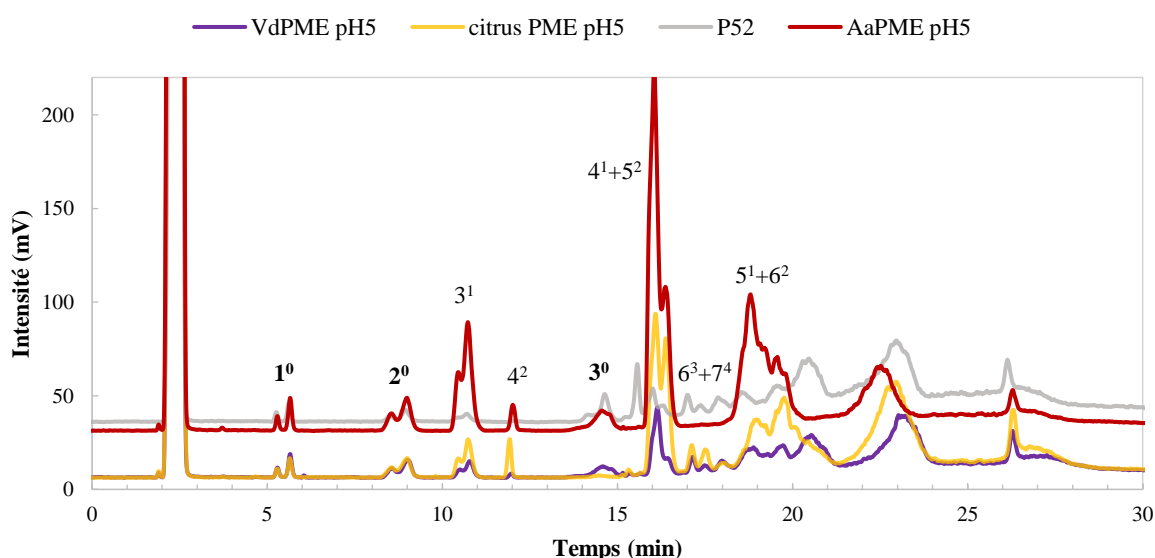


Figure 4.30 : chromatogramme des oligomères des pectines initiales (gris) et après modification par AaPME (rouge), VdPME (violet) ou PME citrus (jaune) d'un matériau MFC/P52 à pH 5.

Contrairement à ce qui a déjà été décrit dans la partie I pour l'échantillon déméthylé par AaPME, la déméthylation par VdPME (violet) mène à un profil d'oligomères équivalent à celui obtenu pour les pectines P52 non modifiées (gris).

La réaction avec PME citrus mène à un profil d'oligomères légèrement différent. Or, au vu des résultats de DM, il semble que cette réaction n'ait pas significativement modifié les pectines. Ce résultat est donc étonnant. Aussi, pour ces deux échantillons, la diminution voire disparition du pic correspondant au triAGal (3⁰) n'est pas expliquée.

Pour les échantillons issus des réactions à pH 8 avec AaPME ou VdPME, les profils d'élution sont équivalents à ceux obtenus à pH 5. Ce n'est pas le cas pour les échantillons issus des réactions avec PME citrus. Or, au vu des résultats de DM, il semble que cette réaction n'ait pas significativement

modifié les pectines quel que soit le pH. L'ensemble des résultats obtenus pour les réactions avec PME *citrus* est donc difficile à interpréter.

Les pics correspondant aux oligomères AGal (1⁰), diAGal (2⁰) et triAGal (3⁰) sont ensuite intégrés pour calculer le DB et le DB_{abs} à partir de leur concentration.

III.1.b.ii DB et DB_{abs}

Les valeurs de DB et DB_{abs} calculées pour les différentes conditions de réaction avec les PME sont récapitulées dans le tableau suivant et les Figure 4.31 A et B permettent de les comparer.

Tableau 4.15 : récapitulatif des caractéristiques structurales des pectines après réaction des matériaux MFC/P52 avec différentes PME à pH 5 et à pH 8. Réaction PME : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, V = 0,6 mL.

Enzyme	pH	DM (%)	DB (%)	DB _{abs} (%)
Contrôle	5	47,2	17,6	8,3
AaPME	5	28,5	16,8	12
VdPME	5	36,8	17,8	11,2
PME <i>citrus</i>	5	46,8	20	10,6
AaPME	8	33,6	17,2	11,4
VdPME	8	34,6	18,6	12,2
PME <i>citrus</i>	8	45,3	9,4	5,1

Lorsque l'on s'intéresse aux valeurs de DB, il n'y a pas de différence avec les pectines initiales après déméthylation par AaPME et VdPME aux deux pH et pour PME *citrus* à pH 5.

Pour AaPME et VdPME, le pH ne semble donc pas avoir modifié la processivité de l'enzyme. Ces valeurs sont également proches du DB mesuré avec les pectines P52 non déméthylées (Figure 4.31).

Les faibles DB et DB_{abs} obtenus après réaction de la PME *citrus* à pH 8 ne sont pas expliqués. Il est possible que des traces d'enzymes PG ou PL soient présentes dans cette PME commerciale et modifient la structure des pectines seulement à un certain pH. Mais cela conduirait à une diminution de la quantité de pectines dans le matériau (voir partie III.2 sur les PG) et aucune diminution du pourcentage de pectines dans ces échantillons n'a été observé avec l'analyse RMN. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre le comportement des pectines après réaction avec PME *citrus*.

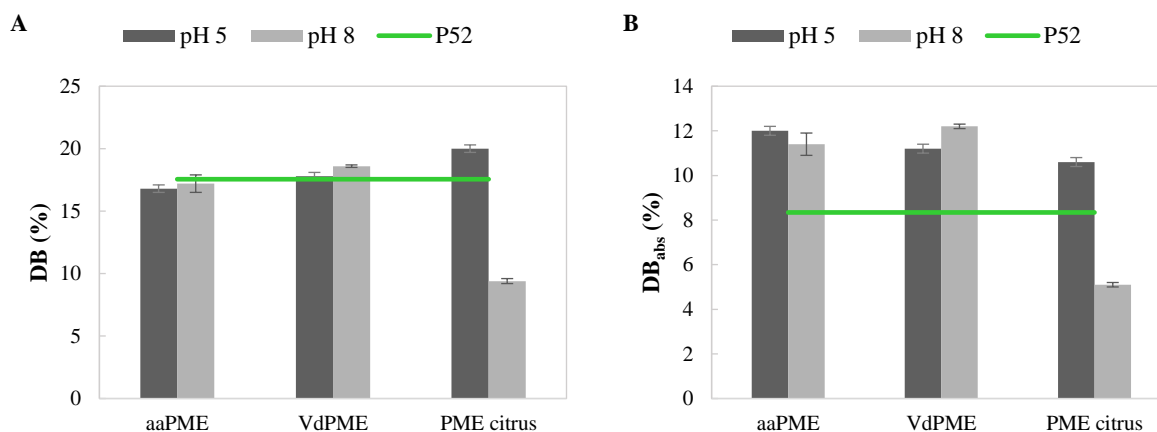


Figure 4.31 : comparaison de DB (A) et DB_{abs} (B) des pectines après réaction des matériaux MFC/P52 avec différentes PME à pH 5 et à pH 8. Réaction PME : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, V = 0,6 mL. Ligne verte = pectines initiales.

À part pour PME *citrus* à pH 8, les différentes conditions de réactions de déméthylation semblent donc mener à des distributions de motifs équivalents.

D'après Ralet *et al.* (2012), le DB de pectines aux motifs blocs est indépendant du DM lorsque celui-ci est inférieur à 60%. Au contraire, le DB des pectines méthylées aléatoirement varie de façon

significative avec le DM. Il semble donc que cette série présente des pectines aux motifs plutôt blocs. Ce résultat est attendu pour les PME processives (VdPME et PME *citrus*) mais pas pour AaPME. Cette dernière est très réactive, même sur les matériaux, et la déméthylation extensive des pectines peut mener à des motifs blocs que le mode d'action de l'enzyme soit processif ou aléatoire. Une autre hypothèse est qu'en présence de cellulose, en milieu dense, le mode d'action de la PME fongique soit modifié (Bonnin et al., 2015). Le DB reste cependant relativement faible comparé à ceux qui peuvent être observés pour des pectines aux motifs blocs dans la littérature (Tableau 4.3) et par rapport aux pectines commerciales P35.

La légère augmentation du DB_{abs} après réaction avec les PME peut résulter de l'augmentation de la taille des blocs.

Cependant, plus de résultats, sur une plus large gamme de DM, sont nécessaires pour vérifier ces observations. Aussi le motif initial des pectines n'est pas certains et selon celui-ci, des modes de déméthylation aléatoire ou processif peuvent mener à une même valeur de DB (Ralet et al., 2012).

III.1.c Propriétés mécaniques

Toujours dans l'optique de relier les modifications structurales des pectines à l'évolution des propriétés mécaniques des matériaux, celles-ci sont caractérisées par essai de traction.

III.1.c.i Observations générales

Des courbes représentatives des propriétés des matériaux après réaction avec les PME à pH 5 ou à pH 8 sont représentées dans la figure suivante.

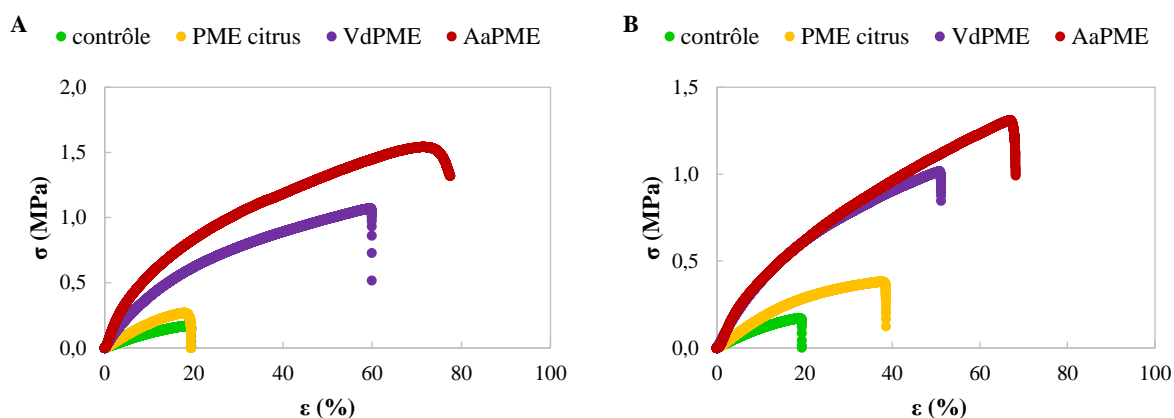


Figure 4.32 : courbes de traction des matériaux avant et après réactions avec différentes PME à pH 5 (A) et à pH 8 (B). Réaction : 2h, $[PME] = 0,5 \mu\text{g/mL}$, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$.

Les moyennes des modules des échantillons de chaque réaction sont calculées et rassemblées avec les autres paramètres mesurés dans le tableau suivant.

Tableau 4.16 : ensemble des propriétés obtenues après réaction de déméthylation avec différentes PME des matériaux MFC/P52. Réaction : 2h, $[PME] = 5 \mu\text{g/mL}$, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, $V = 0,6 \text{ mL}$.

Enzyme	pH	DM (%)	DB (%)	DB_{abs} (%)	q	E (Mpa)
Contrôle	5	47,2	17,6	8,3	5,5	1,3
AaPME	5	28,5	16,8	12,0	4,3	9,7
VdPME	5	36,8	17,8	11,2	4,1	5,5
PME <i>citrus</i>	5	46,8	20,0	10,6	4,7	2,2
AaPME	8	33,6	17,2	11,4	4,9	6,1
VdPME	8	34,6	18,6	12,2	5,0	5,1
PME <i>citrus</i>	8	45,3	9,4	5,1	5,2	2,0

Comme évoqué dans la partie I de ce chapitre, le taux de gonflement varie peu avec le DM mais le module augmente lorsque le DM diminue. Un plus grand nombre de jonctions calcium peuvent se former au sein du matériau suite à la déméthylation des pectines.

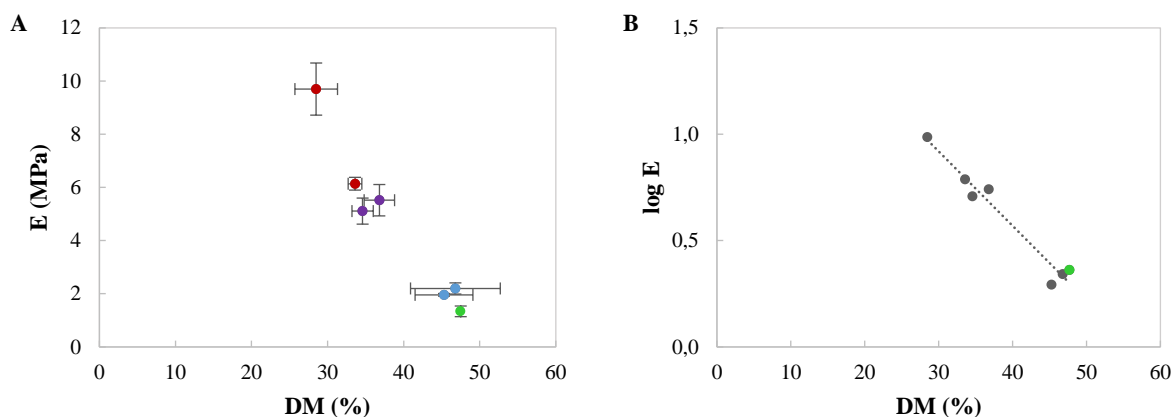


Figure 4.33 : évolution du module E (A) ou de son logarithme (B) et fonction du DM des pectines des matériaux MFC/P52 modifiés par différentes PME (Tableau 4.16).

Une corrélation équivalente à celle de la partie I du chapitre, entre le logarithme du module et le DM, est observée, avec une pente de -0,03. Cette pente est équivalente à ce qui est observé pour les PME de plantes (Tableau 4.9).

Cette évolution du module avec le DM semble confirmer les observations issues de la caractérisation du DB des pectines après déméthylation par les différentes PME : le mode de déméthylation de AaPME n'est pas discernable de celui de VdPME et PME *citrus*. Il serait cependant nécessaire d'avoir plus de données pour confirmer cette tendance.

III.1.c.ii Comparaison des différentes enzymes

Lorsque l'on compare l'impact des différentes PME sur les matériaux, la plus forte réactivité de AaPME à pH 5 est mise en évidence par un module plus élevé par rapport aux modules mesurés pour les autres PME.

À pH 8, le module pour AaPME est équivalent à celui mesuré pour VdPME. Le DM des pectines après ajout de PME *citrus* n'est pas significativement différent de celui du matériau d'origine. Cependant, on observe une légère augmentation du module d'élasticité qui laisse penser que PME *citrus* a quand même légèrement réagit.

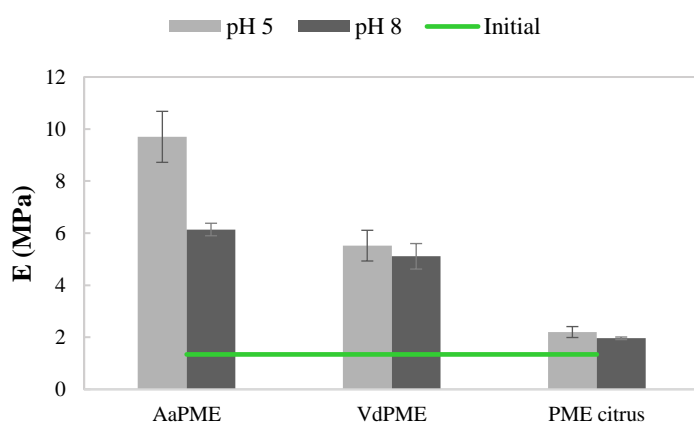


Figure 4.34 : comparaison des modules E des matériaux MFC/P52 après modification par différentes PME à pH 5 et à pH 8. Réaction : 2h, [PME] = 5 µg/mL, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, V = 0,6 mL. Ligne verte = matériau non modifié (pH =5).

En revanche, d'après les résultats de DB, qui sont équivalents pour l'ensemble des réactions, le module est principalement dépendant du DM des pectines. Aussi pour PME *citrus*, l'obtention d'un module équivalent à pH 5 et à pH 8 confirme l'hypothèse d'une erreur de mesure au niveau du DB à pH 8.

III.1.c.iii Rôle du motif d'estérification

D'après plusieurs études (Fraeye et al., 2010a; Ström et al., 2007), le module d'élasticité de gels de pectines augmente linéairement avec le pourcentage DB_{abs} .

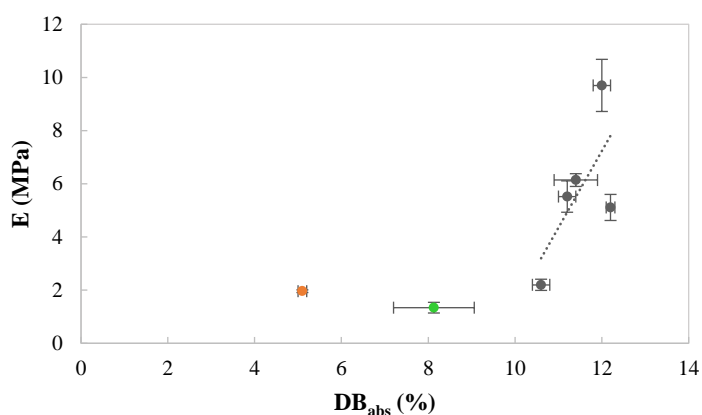


Figure 4.35 : évolution du module E en fonction du DB_{abs} des pectines des matériaux MFC/P52 modifiés par différentes PME (Tableau 4.15). Point vert = pectines initiales, point orange (exclu) = PME citrus à pH 8.

On peut observer une légère tendance dans ce sens mais des données supplémentaires seraient nécessaires pour valider ces observations dans le cas des matériaux biomimétiques.

III.1.c.iv Propriétés à la rupture

Les contraintes et déformations à la rupture, issues des essais de traction des matériaux après les différentes réactions enzymatiques, sont représentées dans les Figure 4.36 A et B.

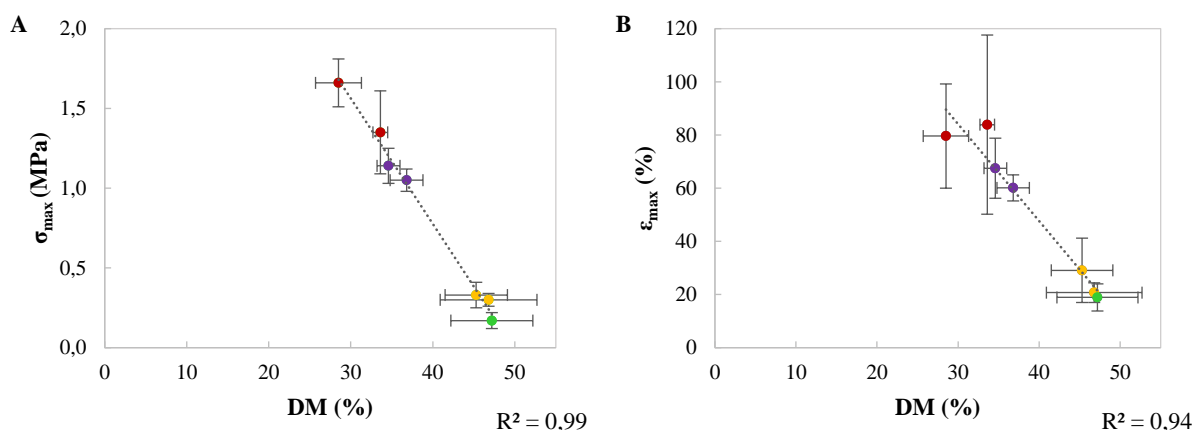


Figure 4.36 : évolution de la contrainte à la rupture (A) et de la déformation à la rupture (B) en fonction du DM des pectines des matériaux modifiés par différentes PME.

On observe des relations linéaires des contraintes et déformations à la rupture avec le DM. On a vu que pour ces matériaux, le taux de réticulation n'est pas relié de façon proportionnelle avec le DM. Il semblerait donc que les propriétés à la rupture ne soient pas reliées de façon proportionnelle au taux de réticulation.

III.1.d Synthèse et comparaison avec phénotypes sur végétaux

En plus de AaPME, il a été montré qu'une autre PME, VdPME, est aussi réactive sur les matériaux biomimétiques. Mais pour PME *citrus*, la présence de cellulose semble ralentir ou inhiber son activité.

La détermination des DB n'a pas permis de montrer une différence de processivité entre AaPME et VdPME. Il pourrait être intéressant de réaliser des réactions plus courtes pour vérifier si en début de réaction, des motifs différents peuvent être identifiés.

Des applications sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* de VdPME et PME *citrus* ont été réalisés par l'équipe BIOPI. Avec une application de VdPME, les longueurs de l'hypocotyle et des racines diminuent par rapport à celles des plants témoins, et ce pour les deux pH. D'après les résultats observés sur matériaux biomimétiques, une augmentation de la rigidité de la paroi pourrait en être à l'origine.

Après application de PME *citrus*, il a été observé une différence de processivité selon le pH d'application. D'après leur analyse, à pH 5, les pectines extraites étaient constituées de motifs plutôt aléatoires alors qu'à pH 8, les motifs semblaient plutôt être de type blocs. Il n'a cependant pas été possible de vérifier ces observations sur les matériaux biomimétiques car PME *citrus* semble sensible à la présence de cellulose. Cela ouvre de nombreuses questions sur sa diffusion dans la paroi. Il serait intéressant de vérifier l'activité de PME *citrus* sur un milieu de pectines diluées en présence de MFC.

Pour comprendre le lien entre modifications des pectines et croissance pariétale, il est aussi nécessaire de s'intéresser aux enzymes de clivages des homogalacturonanes, tels que les polygalacturonases.

III.2 Polygalacturonases de plantes

Les PG de plantes appartiennent, comme les PME, à de larges familles multigéniques mais elles sont encore peu étudiées. Elles peuvent aussi jouer un rôle dans l'élongation de la paroi (Sénéchal et al., 2014). Une des hypothèses majeures est qu'après déméthylation par le PME, les pectines seraient des substrats plus favorables aux PG. Aussi, l'acidification locale de la paroi lors de la déméthylation des pectines favoriserait l'activité des PG (Hocq et al., 2017).

Trois PG différentes, exprimées dans différentes régions chez *Arabidopsis thaliana*, sont comparées :

- PGLR : PolyGalacturonase Lateral Root, exprimée dans les racines latérales ;
- ADPG2 : Arabidopsis Dehiscence zone PolyGalacturonase 2, exprimée au niveau des zones d'ouverture des organes ;
- VPG1 : Vessel PolyGalacturonase 1, exprimée au niveau des vaisseaux.

III.2.a Activités en solution

Ces enzymes ont été étudiées en détail sur des pectines d'agrumes de références, en milieu aqueux, par l'équipe BIOPI. Ils ont observé une différence de réactivité des PG selon le DM des pectines (Figure 4.37).

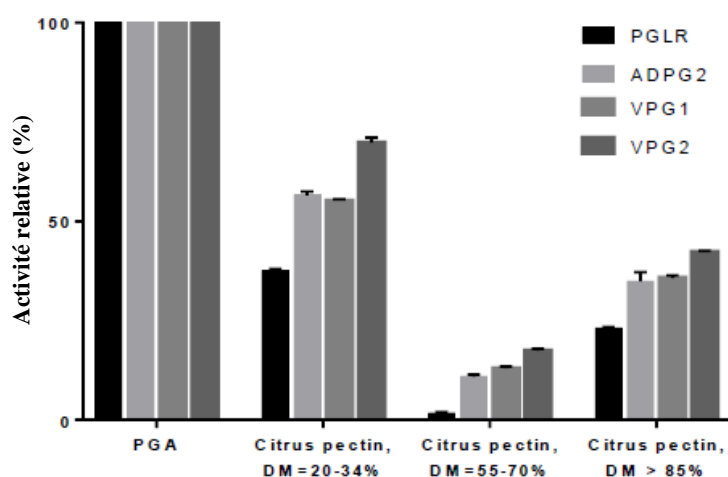


Figure 4.37 : activités relatives des PG avec des pectines de différents DM, en solution, par rapport à l'activité des PG avec de l'acide polygalacturonique (PGA). © Wafae Tabi.

De façon globale, l'activité est plus faible en présence de méthylesters. L'enzyme PGLR est la plus impactée par le DM. L'augmentation de l'activité à des DM supérieurs à 85% comparé à celle des DM intermédiaires (55-75%) n'est pas claire.

Dans la suite, les quantités d'enzymes ajoutées au milieu réactif correspondent aux quantités permettant d'être à isoactivité sur le PGA. Des réactions à la fois sur des matériaux MFC/P52 et sur des matériaux MFC/P35 ont été réalisées pour vérifier l'impact du DM dans ces conditions de réactions.

III.2.b Modifications structurales des matériaux MFC/P52 par les PG

Le matériau utilisé dans la plupart des expériences précédentes étant composé de 70% de pectines de DM 52% et de 30% de MFC, les premières caractérisations de l'activité des PG sont réalisées sur cette composition. La durée de réaction est initialement choisie à 2h afin d'éviter une complète dépolymérisation des pectines qui rendrait impossible la mesure des propriétés mécaniques. Cependant, le DM des pectines de 52% étant peu favorable à l'activité des PG, une durée de réaction largement supérieure est en fait nécessaire pour observer et quantifier des modifications structurales et des propriétés mécaniques du matériau. Seules les réactions de 16h sont donc détaillées dans cette partie. Elles sont réalisées dans 0,6 mL de milieu tamponné à pH 5, un pH proche du pH optimum d'activité de ces PG.

III.2.b.i Évolution de la fraction de pectines dans le matériau

Au cours de la dégradation des pectines, les oligomères formés vont se solubiliser dans le milieu réactif menant à une diminution de la fraction de pectines restantes dans le matériau à la fin de la réaction. Cette fraction peut être quantifiée par RMN.

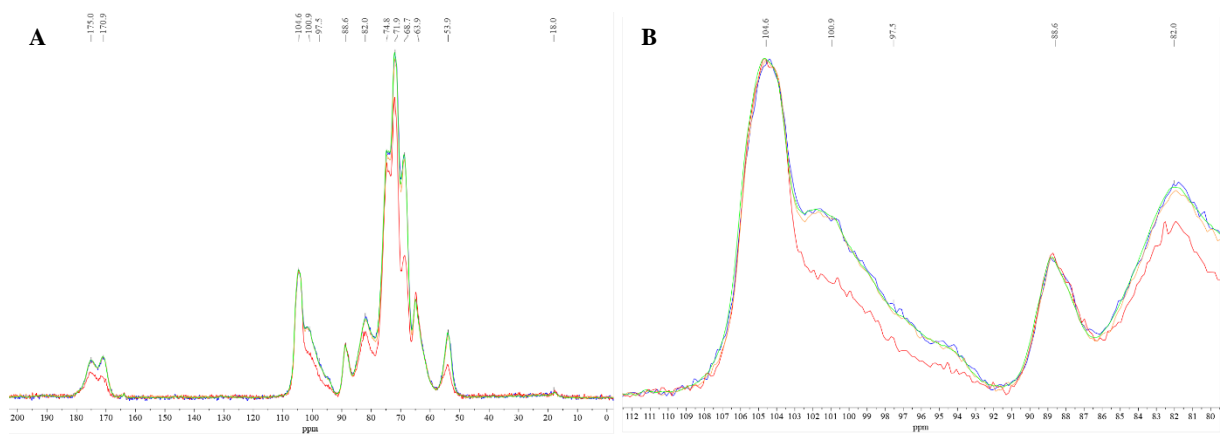


Figure 4.38 : spectre RMN (A) des matériaux MFC/P52 initial (vert) et après réaction avec PGLR (bleu), ADPG2 (rouge) ou VPG1 (jaune). (B) zoom du spectre (A) sur les pics des C₁ de la cellulose (104,6 ppm) et des pectines (100,9 ppm). Réaction PG : 16h, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, pH 5, V = 0,6 mL.

On remarque qu'après réaction avec ADPG2, le pic correspondant au C₁ de l'acide galacturonique (100,9 ppm) diminue comparé à celui du matériaux de contrôle (vert) et des réactions avec les autres PG (Figure 4.38). L'intégration des pics correspondant aux acides et esters des pectines (168 – 180 ppm) permettent de calculer un pourcentage de pectines dans le matériau (Figure 4.39).

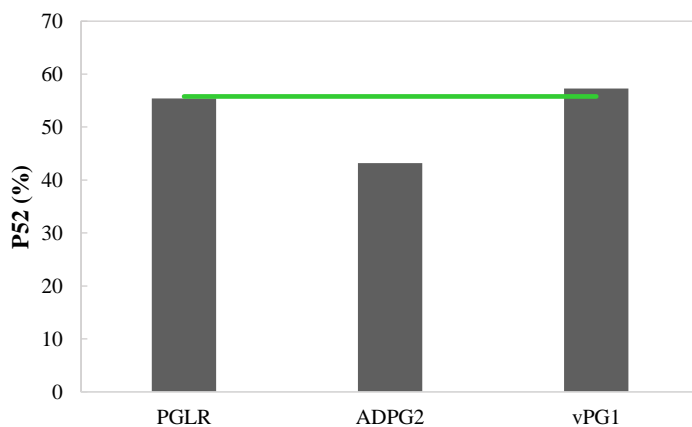


Figure 4.39 : comparaison des pourcentages de pectines déterminés par analyse RMN des matériaux MFC/P52 après réaction avec différentes PG. Réaction : 16h, [Ca²⁺] = 0,1 mol/L, pH 5, V = 0,6 mL. Ligne verte = matériau non modifié.

Le matériau a perdu environ 15% de pectines au cours des 16h de réaction avec ADPG2. Les pourcentages de pectines des matériaux mis en présence de PGLR et de VPG1 pendant 16h n'ont pas été modifiés par rapport au matériau de contrôle.

Contrairement à ADPG2, ces enzymes semblent donc inactives sur les matériaux MFC/P52. PGLR est déjà très peu active sur des pectines de DM environ 52% solubilisées ce qui peut expliquer ce résultat. Mais VPG1 est aussi active qu'ADPG2 sur ces pectines en solution, il semble donc que le substrat sous forme de matériau non soluble modifie son activité. Les sucres déméthylés formant des jonctions avec les ions calcium, ils sont moins accessibles pour les enzymes. Il est également possible que la présence calcium en elle-même ait un effet sur la protéine. La quantité de cellulose peut aussi être un facteur impactant l'enzyme.

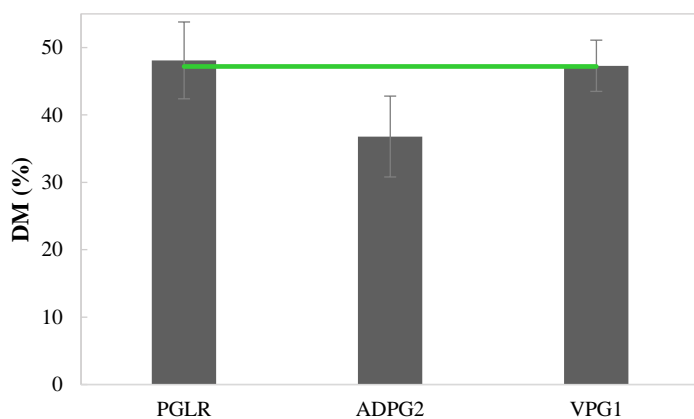


Figure 4.40 : comparaison des DM des pectines des matériaux MFC/P52 après réaction avec différentes PG. Réaction : 16h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Lorsque l'on s'intéresse au DM de pectines des matériaux après réaction, on observe qu'il diminue d'environ 10% pour le matériau modifié par ADPG2 (Figure 4.40). Cela signifie que plus de pectines ou d'oligomères fortement méthylés se sont solubilisés au cours de la réaction. Cela peut confirmer la difficulté pour l'enzyme d'accéder aux zones plus déméthylées mais réticulées par les ions calcium.

III.2.b.ii Évolution de la masse molaire des pectines

Les masses molaires moyennes des pectines restantes dans le matériau après réactions sont déterminées par chromatographie liquide SEC-MALS. Les Figure 4.41 A et B comparent les profils d'élution, obtenus par réfractométrie (RI) et diffusion de la lumière (LS) respectivement, des pectines issues du matériau de contrôle (vert) et de celles issues du matériau sur lequel ADPG2 a réagi (bleu).

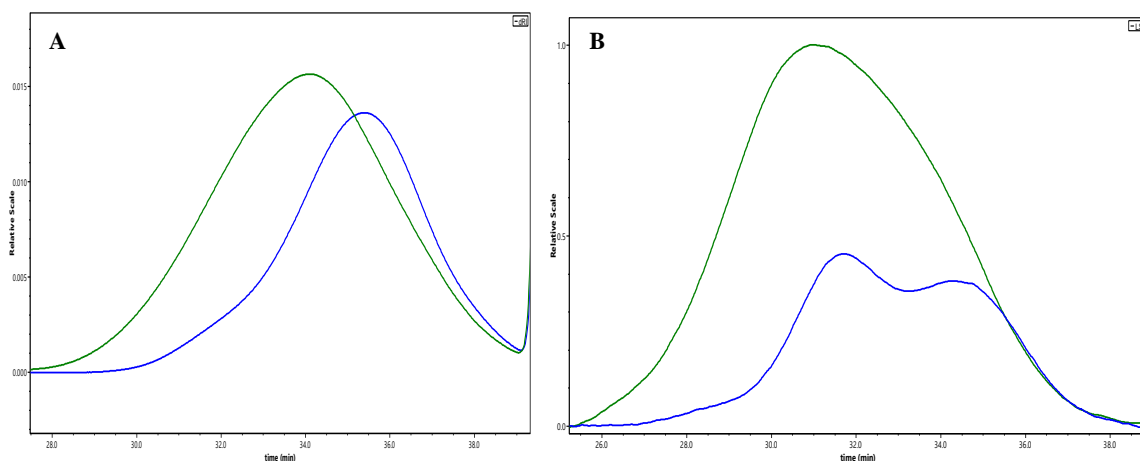


Figure 4.41 : chromatogrammes après détection RI (A) ou LS (B) des pectines des matériaux MFC/P52 non modifiés (vert) et après modification par ADPG2 (bleu).

On peut observer un décalage des temps de rétention correspondant à une diminution de la masse molaire moyenne des pectines de l'échantillon après action de ADPG2.

La détection LS met en avant la présence d'une fraction de pectines élue à 32 min de masse molaire moyenne plus élevée que la fraction majoritaire détectée par RI. Elle pourrait correspondre à une fraction de pectines moins dégradées car moins accessibles pour l'enzyme. Cependant, la méthode de détection

RI montre que cette population représente une faible fraction de l'échantillon (10%). L'ensemble des deux populations est pris en compte dans le calcul des masses molaires moyennes de ces échantillons.

Les profils d'élution des pectines des matériaux ayant été en présence de PGLR et de VPG1 sont équivalents au profil d'élution du matériau de contrôle.

Les masses molaires moyennes en poids (M_w) et en nombre (M_n) sont calculées (Figure 4.42) et confirment l'efficacité de seulement ADPG2 sur la dépolymérisation des pectines des matériaux biomimétiques.

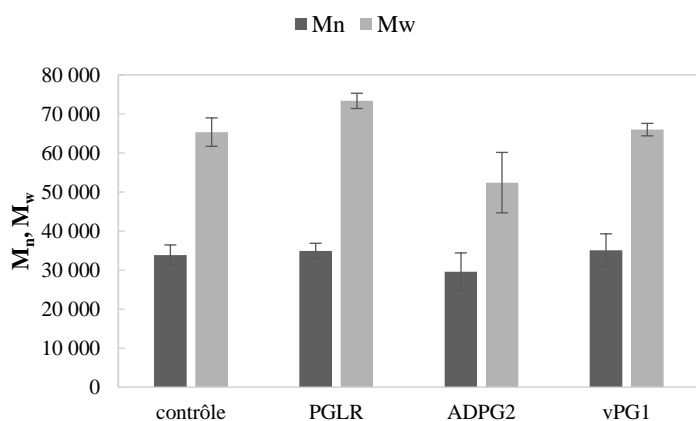


Figure 4.42 : masses molaires moyennes en poids (M_w) et en nombre (M_n) des pectines des matériaux MFC/P52 non modifiés (contrôle) ou après réaction avec différentes PG.

Réaction : 16h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$.

On peut également remarquer que l'indice de polydispersité, $I = \frac{M_w}{M_n}$, diminue avec la dégradation par ADPG2.

III.2.b.iii Oligomères dans le milieu de réaction

Le milieu réactif a été analysé par l'équipe BLOPI en LCMS afin de déterminer la nature des oligomères libérés par l'action des PG sur les matériaux biomimétiques. La quantité totale d'oligomères de DP 1 à DP 30 est représentée pour chaque milieu réactif grâce à l'aire totale du chromatogramme.

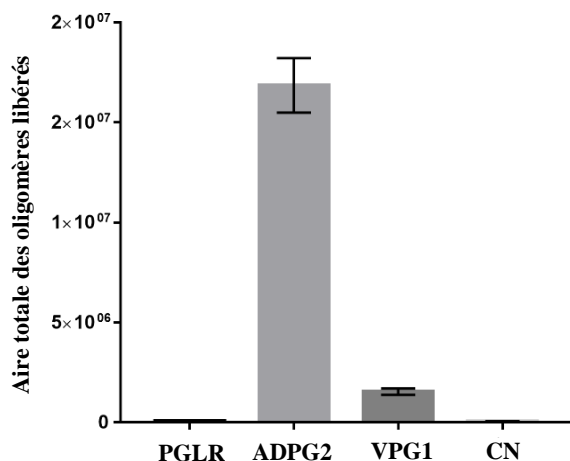


Figure 4.43 : comparaison des aires totales des oligomères identifiés en LCMS et libérés par la dégradation des matériaux MFC/P52 par différentes PG. CN = matériau non modifié. © Wafae Tabi

Tout comme les caractérisations précédentes, celle-ci confirme la réactivité d'ADPG2 sur les matériaux car beaucoup d'oligomères sont libérés dans le milieu réactif.

En revanche, on remarque que VPG1 a également contribué à libérer des oligomères. Contrairement aux caractérisations précédentes qui laissaient penser que VPG1 était inactive sur les matériaux, la présence d'oligomères dans le milieu montre qu'un début de réaction a eu lieu. La cinétique de réaction de VPG1 sur le matériau est donc très ralentie par rapport à celle d'ADPG2 mais pas totalement inhibé comme c'est le cas pour PGLR.

Les modifications structurales observées indiquent toutes qu'ADPG2 est significativement active sur ces matériaux. Il semblerait que VPG1 soit très légèrement active car elle libère quelques oligomères. En revanche, PGLR paraît complètement inactive, ce qui n'est pas étonnant car cette enzyme est déjà peu active sur les pectines de ce DM en solution.

Les conséquences de ces dégradations du réseau pectique sur les propriétés mécaniques sont ensuite analysées.

III.2.c Modification des propriétés mécaniques des matériaux MFC/P52

L'activité des PG sur les matériaux peut aussi être facilement identifiée grâce aux mesures de leurs propriétés mécaniques après réaction. La dégradation du réseau pectique et la solubilisation des oligomères doit entraîner une diminution de la rigidité et de la résistance à la traction des matériaux.

Des courbes de tractions représentatives des 3 séries caractérisées et des échantillons de contrôle sont représentées dans la figure suivante.

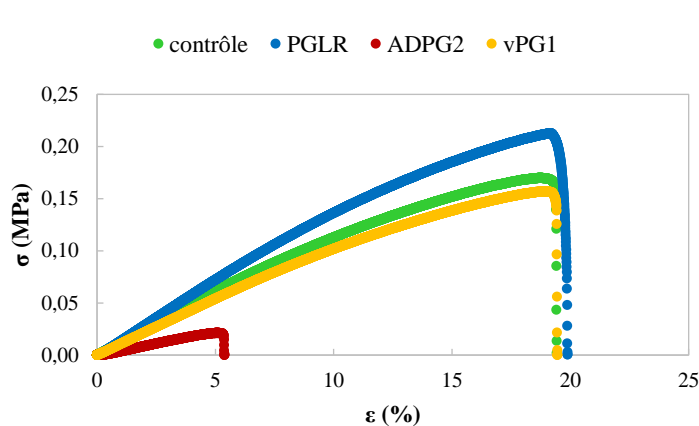


Figure 4.44 : courbes de traction des matériaux avant (vert) et après réactions avec différentes PG. Réaction : 16h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$.

Les variations du module et de la déformation à la rupture selon le traitement enzymatique sont analysées.

III.2.c.i Module d'élasticité

Les taux de gonflement des matériaux après réaction avec les PG ne sont pas significativement différents du taux de gonflement du matériau n'ayant pas été mis en présence de PG. Les modules obtenus par essai de traction sont donc directement comparables (Figure 4.45).

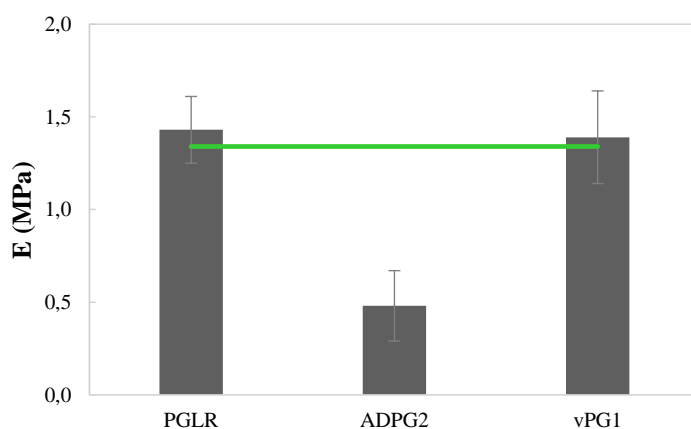


Figure 4.45 : comparaison des modules E des matériaux MFC/P52 après modification par différentes PG. Réaction : 16h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Le module des matériaux ayant réagi avec ADPG2 est 3 fois plus faible que celui du matériau de contrôle ou des matériaux ayant été en présence de PGLR et VPG1.

Ces résultats confirment les conclusions résultant des analyses structurales. ADPG2 a suffisamment dégradé le réseau pectique ce qui a semble-t-il conduit à une réduction de la densité de réticulation du gel. Les dégradations causées par VPG1 ne sont en revanche pas suffisantes pour fragiliser le réseau pectique.

III.2.c.ii Déformation à la rupture

Les matériaux sont très fragiles et les propriétés à la rupture sont donc difficile à quantifier précisément. On peut cependant noter une nette diminution de l'élongation à la rupture des matériaux après réaction avec ADPG2 (Figure 4.46).

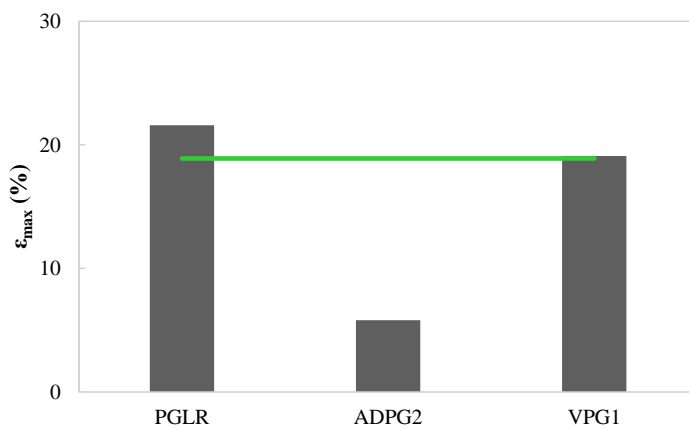


Figure 4.46 : comparaison des déformations à la rupture des matériaux MFC/P52 après modification par différentes PG. Réaction : 16h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$. Ligne verte = matériau non modifié.

Ce résultat montre que le matériau devient à la fois moins rigide mais aussi plus fragile. Le réseau pectique formé par les pectines de DM 52% est donc modifié de façon significative en présence d'ADPG2. Le gel n'est plus suffisamment élastique pour limiter la rupture des matériaux.

La caractérisation des propriétés mécaniques permet de confirmer les observations issues des caractérisations structurales des pectines. En 16h, ADPG2 a modifié de façon conséquente le réseau pectique. On ne peut cependant pas détecter l'initiation d'une dégradation par VPG1 avec ces mesures.

III.2.d Synthèse et comparaison avec phénotypes sur végétaux

Trois PG différentes ont été appliquées aux matériaux biomimétiques MFC/P52. Ces applications n'ont pas eu les mêmes conséquences selon les enzymes.

ADPG2, une enzyme s'exprimant dans les zones d'ouverture des organes chez *A. thaliana*, a conduit à une dégradation des pectines du matériau. VPG1, une enzyme s'exprimant dans les vaisseaux, a semble-t-il dépolymérisé quelques pectines mais très peu, ce qui n'a pas engendré de modification des propriétés mécaniques du matériau.

Ce résultat est intéressant car sur des pectines solubilisées, VPG1 et ADPG2 ont une réactivité similaire. Le changement de substrat a donc des conséquences plus importantes sur l'activité de VPG1 que sur celle d'ADPG2. Ces deux enzymes sont de tailles équivalentes mais des différences de structures chimiques de ces enzymes peuvent conduire à des différences de diffusion dans le substrat biomimétique.

Ces observations sont également en accord avec les phénotypes observés après applications de ces enzymes dans des milieux de croissance de plants d'*A. thaliana*, réalisées par l'équipe BIOPI. Une réduction de la longueur de l'hypocotyle est observée après application d'ADPG2 (Figure 4.47). Ce phénomène est également accompagné d'un détachement des cellules du tissu (voir annexe III.2). En revanche, après application de VPG1, la longueur n'est pas modifiée et aucun détachement de cellules n'est observé.

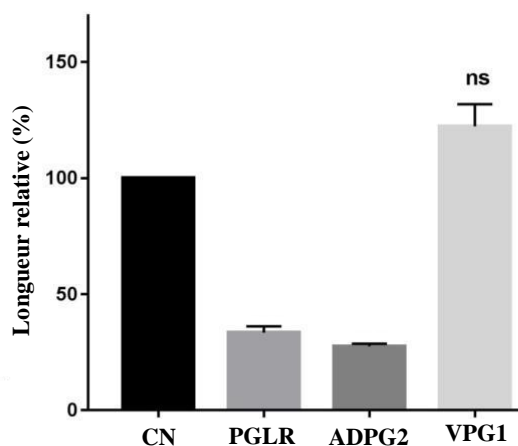


Figure 4.47: comparaison des longueurs relatives d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* sans (CN) et avec application des différentes PG dans le milieu de culture. ns : différence non significative avec CN. © Wafae Tabi

Sur cette figure, on peut également remarquer que PGLR, l'enzyme s'exprimant dans les racines latérales, contribue également à une réduction de la longueur de l'hypocotyle. Cependant, sur les matériaux biomimétiques, aucun effet n'est observé. L'hypothèse la plus pertinente est que le DM des pectines P52 rend le substrat très peu favorable pour cette enzyme comme observé avec les activités sur pectines solubilisées.

Afin de vérifier cette hypothèse, des applications des PG ont été réalisées sur des matériaux MFC/P35, contenant donc des pectines ayant un DM plus favorable à l'attaque des PG. Cependant une application de seulement 2h a pu être réalisée et aucun effet n'a été observé. Le matériau MFC/P35 est très peu gonflé ce qui peut avoir pour conséquence de limiter encore plus la diffusion de l'enzyme par rapport au matériau MFC/P52. Il serait intéressant d'effectuer des essais cinétiques avec ces matériaux pour comparer les vitesses de réactions des trois enzymes.

Un autre moyen d'évaluer l'activité des PG sur les matériaux biomimétiques de différents DM est de les appliquer après une modification par une PME.

III.3 Combinaison PME et PG

Dans la paroi végétale, les pectines sont modifiées à la fois par des PME et des PG. Les hypothèses actuelles suggèrent que les pectines, fortement méthylées lors de leur insertion dans la paroi, sont d'abord déméthylées par les PME afin de créer des substrats accessibles ensuite aux PG.

III.3.a Principe

Afin de mimer ce phénomène, une combinaison de ces deux types de réaction est réalisée sur les matériaux biomimétiques MFC/P52 (30%/70%). Les matériaux sont d'abord mis en présence de VdPME à pH 5 pendant 2h. Cette enzyme contribue à obtenir un DM intermédiaire entre 52% et 30%.

À la suite de cette réaction, les matériaux sont mis en présence d'ADPG2 également à pH 5 et pendant 2h. Comme évoqué dans la partie III.2.b *Modifications structurales des matériaux MFC/P52 par les PG*, une réaction de 2h avec ADPG2 ne présentait pas de différence significative des structures des pectines et des propriétés mécaniques. Mais l'analyse du milieu de réaction a permis de montrer la libération d'oligomères et donc en réalité une légère réactivité.

III.3.b Résultats

Les caractérisations réalisées sur ces matériaux sont résumées dans le Tableau 4.17 et comparées à celles des réactions simples dans les mêmes conditions.

Tableau 4.17 : rappel des propriétés obtenues pour les applications simples et résultats obtenus après application de VdPME puis ADPG2 sur les matériaux MFC/P52.

Réactions : 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$.

Enzyme	DM (%)	q	E (MPa)	σ (MPa)	ϵ (%)
Contrôle	47,2	5,5	1,34	0,17	18,9
VdPME	36,8	4,1	5,52	1,05	60,1
ADPG2	47,3	4,5	1,23	0,13	16,1
VdPME + ADPG2	36,7	5,1	5,24	0,67	28,79

On observe que le DM obtenu après réaction de VdPME et ADPG2 reste équivalent à celui des matériaux après réaction avec seulement VdPME. Il n'y a donc pas eu de solubilisation significative de pectines fortement méthylées lors de la dégradation par ADPG2.

III.3.b.i Oligomères libérés

Les oligomères libérés dans le milieu réactif sont analysés en LCMS par l'équipe BIOPI.

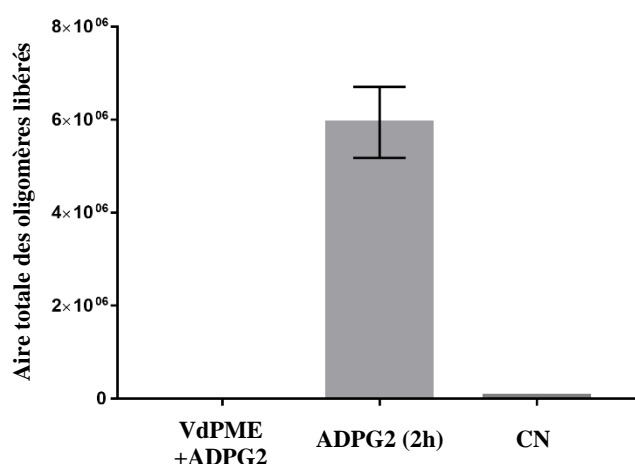


Figure 4.48 : comparaison des aires totales des oligomères identifiés en LCMS et libérés par la dégradation des matériaux MFC/P52 par ADPG2 avec ou sans modification préalable par VdPME. CN = matériau non modifié. © Wafae Tabi

On observe que la réaction de 2h d'ADPG2 sur les pectines modifiées par VdPME ne libère aucun oligomère en comparaison de la réaction de la même durée sur les matériaux MFC/P52 non modifiés.

Il semblerait donc que malgré un DM supposé être préférentiel pour l'enzyme, les acides galacturoniques lui sont inaccessibles. La réaction ayant lieu en milieu calcium, on peut supposer que leur réticulation empêche les interactions avec ADPG2. Les pectines semblent donc former plus de jonctions calciques après modification par VdPME.

Il est alors intéressant d'analyser les propriétés mécaniques de ces matériaux.

III.3.b.ii Analyse des propriétés mécaniques

Des courbes représentatives sont données en Figure 4.49.

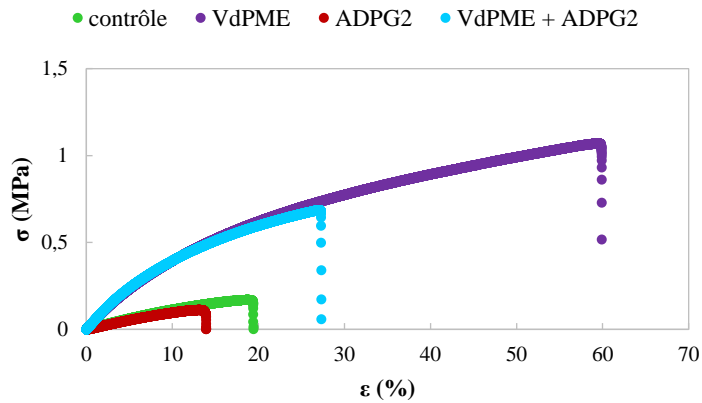


Figure 4.49 : courbes de traction des matériaux avant (vert) et après modifications par VdPME seulement (violet), ADPG2 seulement (rouge) ou VdPME puis ADPG2 (bleu). Réactions : 2h, $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$, pH 5, $V = 0,6 \text{ mL}$.

Lors de la réaction simple avec ADPG2 pendant 2h, les propriétés mécaniques du matériau ne sont pas significativement différentes de celles du matériau initial (contrôle), ce qui laissait suggérer l'absence de réaction sur cette durée.

Lorsque VdPME est appliquée sur les matériaux, une augmentation de l'ensemble des propriétés mécaniques, par rapport à celles du matériau initial est observée et résulte de la formation de jonctions calciques supplémentaires.

De façon intéressante, l'application d'ADPG2 pendant 2h sur ces matériaux préalablement modifiés par VdPME résulte en quelques modifications des propriétés mécaniques. Le module élastique n'est pas modifié mais les contraintes et déformations à la rupture diminuent de façon significative comparées aux matériaux ayant subi seulement une modification par VdPME. Il semble donc qu'ADPG2 a procédé à des clivages qui ne libèrent pas d'oligomères et qui ne modifient pas le taux de réticulation du gel de pectines. Cela confirme que les jonctions calciques sont inaccessibles.

III.4 Synthèse partie III

Des PME de différentes origines et des PG ont été appliquées sur des matériaux biomimétiques et leurs effets ont été comparés aux phénotypes obtenus suite à leur application dans des milieux de cultures de plants en croissance.

Tout d'abord, une PME d'origine fongique, VdPME, permet également de déméthyle les pectines des matériaux, au contraire d'une enzyme d'origine végétale, PME *citrus*, qui semble inactive ou considérablement plus lente sur les matériaux.

Des conclusions similaires à celles dressées dans la partie I sont obtenues pour l'évolution des propriétés mécaniques en relation avec le DM. Une rigidification du matériau a lieu avec la diminution du DM en raison de la présence de calcium permettant de former de nouvelles jonctions. La diminution de l'allongement des cellules d'hypocotyles et de racines chez *Arabidopsis thaliana*, observées après traitement des germinations par VdPME, pourrait être reliée à une augmentation de rigidité de la paroi.

VdPME, contrairement à AaPME, a un mode d'action processif, quel que soit le pH, sur des pectines solubilisées et lors d'application sur des végétaux en croissance. Mais sur les matériaux biomimétiques il n'a pas été possible de distinguer un mode d'action différent entre les deux enzymes probablement car AaPME est beaucoup plus active que VdPME sur ces matériaux.

Ensuite, il a été possible de modifier les matériaux biomimétiques par l'action d'une polygalacturonase, ADPG2. Cette dépolymérisation a conduit à la diminution de la masses molaire moyenne des pectines des matériaux et également à une diminution de leur ratio dans le matériau par libération d'oligomères dans le milieu réactionnel.

Deux autres PG semblent inactives sur le matériau. Pour PGLR, cela peut s'expliquer par la mauvaise affinité de cette enzyme avec les pectines de ce DM. Mais pour VPG1 le résultat est plus étonnant dans la mesure où ADPG2 et VPG1 ont été appliquées à iso-activité. Ceci pourrait être lié à capacités

différentes d'accès à un substrat complexe pour ADPG2. Cela semble cohérent avec l'application de VPG1 sur des cultures d'*A. thaliana* qui ne semble également pas avoir de conséquence sur les parois cellulaires végétales.

Pour ADPG2, les modifications structurales ont pour conséquence la diminution de l'ensemble des propriétés mécaniques du matériau. Ces modifications semblent cohérentes avec les effets mesurés *in planta* où l'application de l'enzyme entraîne une réduction importante de la longueur des hypocotyles chez *A. thaliana*, s'accompagnant d'un détachement cellulaire important.

Enfin, une combinaison des deux types de modification des pectines a été réalisée en appliquant d'abord VdPME sur le matériau puis ADPG2. Cela mène à un matériau pour lequel, par rapport à un matériau uniquement modifié par VdPME, seules les propriétés à la rupture diminuent alors que le module d'élasticité est maintenu. Cela semble indiquer, que sur ces temps de réactions et dans un milieu contenant du calcium, ADPG2 n'est pas capable d'agir sur les structures pectiques issues de la déméthylestérification processive de VdPME, sans doute du fait de la complexation des chaînes avec des ions calcium.

IV. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, des modifications des matériaux biomimétiques de la paroi par des enzymes de remodelage des pectines ont été réalisées.

Dans un premier temps, on s'est intéressé à caractériser l'activité d'une PME de référence, la PME d'*Aspergillus aculeatus*, sur des matériaux MFC/P52. Cette enzyme permet de déméthylater les pectines rapidement jusqu'à un DM d'environ 30%. Comparée à une déméthylation de pectines solubilisées, la réaction sur les matériaux est cependant plus lente car elle dépend de la cinétique de diffusion de l'enzyme au sein du matériau.

Ces modifications de DM entraînent une augmentation du module d'Young et des propriétés à la rupture. Le taux de gonflement est lui peu impacté par ces modifications. Les matériaux dont les pectines sont modifiées jusqu'à un DM d'environ 30% n'atteignent cependant pas les mêmes performances mécaniques que des matériaux constitués initialement de pectines d'un DM équivalent (matériaux MFC/P35). Cela peut en partie s'expliquer par la différence des motifs de déméthylation réalisés par AaPME sur les pectines P52 par rapport aux motifs des pectines P35.

Ensuite, une étude de la réactivité de AaPME en fonction de paramètres physico-chimiques du milieu réactif ou en fonction de la composition du matériau a été réalisée.

Le pH semble avoir peu d'effet sur l'activité de AaPME sauf à pH 8 où l'activité est légèrement réduite. La diminution de la concentration en calcium ne semble pas non plus influencer son activité de façon majeure. Cela peut cependant résulter de la compensation d'une diminution d'activité par une meilleure diffusion de l'enzyme grâce à l'augmentation du gonflement du matériau. En revanche, la diminution du gonflement du matériau par pression osmotique en présence de PEG conduit à un ralentissement conséquent de la cinétique de réaction. Il serait intéressant d'étudier la diffusion de l'enzyme dans le matériau en fonction de son gonflement.

La composition du matériau ne semble pas impacter l'activité tant que le ratio enzyme/pectines reste équivalent. Il serait cependant nécessaire d'étudier plus de compositions pour valider cette conclusion.

Enfin, différents types de PME et de PG ont été appliquées sur les matériaux afin de comparer les conséquences observées sur les matériaux biomimétiques à celles observées suite à leur application sur *A. thaliana*.

Une autre PME fongique VdPME, a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus pour des modifications par AaPME. Sur des pectines pures, cette PME semble pourtant agir de façon processive contrairement à AaPME, dont l'activité est aléatoire. On se serait donc attendu à un impact plus important de la réduction du DM sur les propriétés mécaniques des matériaux modifiés par cette enzyme. Il serait intéressant de réaliser ces essais avec des activités enzymatiques équivalentes entre les deux enzymes, et/ou sur des temps réactionnels plus courts afin de comparer les conséquences, pour des modifications identiques de DM, de processivités enzymatiques distinctes.

L'application d'une PG végétale, ADPG2, a également permis de modifier le matériau biomimétique. Certaines pectines ont été dégradées en oligomères ce qui a eu pour conséquence une diminution des propriétés mécaniques du matériau.

Deux PG ayant la même activité en solution, ADPG2 et VPG1, semblent être impactées différemment selon le type de substrat car elles ne produisent plus les mêmes effets lorsqu'on les applique à des matériaux biomimétiques et à des végétaux, VPG1 ne semblant pas active sur ces substrats.

L'application de VdPME et d'ADPG2 sur des cultures d'*A. thaliana* conduisent toutes les deux à une réduction de la longueur de l'hypocotyle. Pour VdPME, on peut supposer que c'est une conséquence de la rigidification de la paroi, en raison de la complexation des pectines déméthylées avec le calcium, alors que pour ADPG2, cela peut être la conséquence de la dégradation des pectines.

Aussi, la combinaison de ces deux types d'enzymes sur les matériaux biomimétiques a permis de montrer qu'ADPG2 s'attaquait d'abord aux zones non réticulées par le calcium. Ce comportement

résulte en un maintien de la rigidité de la paroi biomimétiques mais en une réduction de sa résistance à la rupture.

En conclusion, les matériaux biomimétiques semblent adaptés pour étudier le comportement d'enzymes de remodelage des pectines et faire le lien avec les effets observés suite à l'application exogène des enzymes sur des germinations d'*Arabidopsis*. Dans un milieu contenant du calcium, la déméthylation permet de former de nouvelles jonctions pectiques assurant une augmentation de l'ensemble des propriétés des matériaux. Cependant, la cinétique d'activité semble être impactée différemment selon l'enzyme et il serait intéressant de pouvoir suivre la diffusion de l'enzyme au sein du matériau. Les PG mènent à la libération d'oligomères ce qui diminue les propriétés des matériaux. Sur une durée de réaction plus courte, la PG semble par contre s'attaquer en priorité aux acides galacturoniques en dehors des jonctions pectiques.

Il est probable que les modifications structurales des pectines entraînent des modifications d'autres propriétés mécaniques telles que la viscoélasticité et la plasticité qui ne sont pas caractérisées avec les essais de traction. Dans le chapitre suivant, on s'intéresse donc à décrire plus en détails le comportement viscoélastique et plastique des matériaux biomimétiques contenant des pectines faiblement méthylées.

Chapitre 5 : Comportement viscoélasto- plastique d'une paroi modèle et modélisation du comportement mécanique

Les premières caractéristiques des matériaux biomimétiques de la paroi primaire ont été étudiées dans le chapitre 3. Ces matériaux sont à la fois des hydrogels polyélectrolytes, grâce aux pectines, et des composites chargés de microfibrilles de celluloses. On a pu aussi constater l'évolution des propriétés des matériaux avec la modification du DM des pectines et donc de la réticulation des gels.

Alors que les deux chapitres précédents considéraient principalement la description élastique en comparant des modules d'Young, ce chapitre cherche à développer la description de ces matériaux complexes. La plasticité et la viscoélasticité des matériaux hydratés sont évaluées grâce à des méthodes de caractérisation des matériaux polymères.

Afin de décrire plus précisément ces résultats, des modèles de viscoélasticité classiques ou issus de travaux sur les parois végétales sont ensuite utilisés. Ces modèles peuvent permettre de définir des paramètres physiques liés aux structures des matériaux et permettant de les comparer entre eux.

On s'intéresse particulièrement à l'effet de la composition du matériau sur les propriétés viscoélastiques et plastiques des matériaux. Seuls des matériaux constitués de pectines de faible DM sont considérés ici car ils sont plus facilement manipulables. Ce chapitre a fait l'objet d'un stage de Master 2, réalisé par Antoine Dartois.

I. Caractérisations mécaniques des matériaux MFC/P35

Trois types de matériaux composés de pectines faiblement méthylées sont étudiés dans ce chapitre. La proportion de cellulose du matériau initial est fixée à 30%. Les compositions sont données dans le tableau suivant.

Tableau 5.1 : compositions des matériaux étudiés dans ce chapitre.

Matériau	MFC (%)	P35 (%)	XG (%)	R _{Ca}
MFC/P35	30	70	0	0
MFC/P35/Ca ²⁺	30	70	0	0,25
MFC/P35/XG/Ca ²⁺	30	40	30	0,25

L'effet de l'introduction du calcium dans le matériau avant séchage est analysé en comparant les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺. Le rôle mécanique du xyloglucane dans ce matériau biomimétique est étudié avec une troisième composition.

Les caractérisations mécaniques sont réalisées sur les matériaux en immersion dans une solution de calcium à 0,1 mol/L.

I.1 Propriétés en traction uniaxiale

Les matériaux sont d'abord caractérisés en traction uniaxiale. Contrairement aux résultats présentés dans le chapitre 3, tous les essais de ce chapitre sont réalisés sur des échantillons immergés. Cela évite le séchage des matériaux et assure un champ de déformation homogène (voir annexe IV.2). La vitesse de déformation est fixée à 0,158 %/s. Les propriétés obtenues dans ces conditions sont rassemblées dans le tableau suivant.

Tableau 5.2 : caractéristiques des matériaux hydratés dans 0,1 mol/L de Ca²⁺.

Matériau	q	φ _{MFC}	E (MPa)
MFC/P35	2,06 ± 0,03	0,097	29,0 ± 5,4
MFC/P35/Ca ²⁺	2,16 ± 0,02	0,093	33,3 ± 5,8
MFC/P35/XG/Ca ²⁺	2,70 ± 0,08	0,074	12,7 ± 0,4

Les matériaux MFC/P35/Ca²⁺ gonflent plus que les matériaux MFC/P35 composés sans calcium, comme cela a été observé pour les matériaux MFC/P52 (voir annexe I.3). Cependant cette différence de gonflement est faible et n'implique pas de différence de module entre les deux matériaux.

Le matériau contenant du xyloglucane se différencie de ces deux premières compositions : il gonfle significativement plus et son module d'élasticité est divisé par deux. La différence de composition conduit à un gonflement plus important qui implique une diminution de la fraction volumique de

cellulose. Comme observé dans le chapitre 3 avec les matériaux composés de pectines P52, la diminution de la fraction volumique de cellulose, liée au gonflement, contribue à cette diminution de rigidité.

Dans les parties suivantes, on cherche à comparer les comportements viscoélastiques et plastiques des matériaux, en s'affranchissant de cette différence de rigidité.

I.2 Caractérisations de la viscoélasticité

La viscoélasticité peut être caractérisée à l'échelle macroscopique par des essais de relaxation de contrainte ou de fluage. Avec ces essais, la dépendance temporelle de la viscoélasticité est facilement identifiable.

I.2.a Relaxation des contraintes

Une déformation instantanée $\varepsilon_0 = 6\%$ est appliquée et maintenue constante pendant le temps de l'essai, d'au moins 12 heures. L'évolution des contraintes $\sigma(t)$ avec le temps est mesurée. Un matériau viscoélastique mettra un certain temps à atteindre une contrainte finale. La contrainte normalisée par σ_0 , la contrainte initiale, est introduite :

$$\Sigma(t) = \frac{\sigma(t)}{\sigma_0} \quad [5.1]$$

Les contraintes normalisées en fonction du temps sont représentées pour les trois matériaux étudiés dans la Figure 5.1.

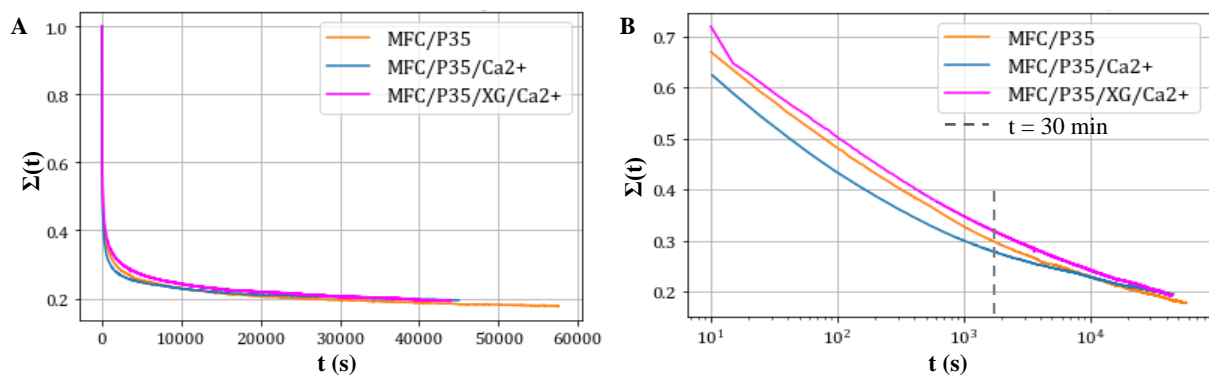


Figure 5.1 : relaxation de la contrainte normalisée avec le temps. Représentation classique (A) et avec une échelle logarithmique (B).

Les trois courbes sont très proches et il est difficile de les distinguer. On remarque qu'au bout de 30 minutes, environ 65% de la contrainte totale s'est relaxée pour chacun des matériaux. Pour les trois matériaux, il reste une contrainte résiduelle d'environ 20% de la contrainte initiale après 12h de relaxation.

L'absence de linéarité en échelle logarithmique montre que les matériaux n'ont pas un seul temps de relaxation caractéristique mais plutôt une distribution de temps de relaxation. Cette allure de relaxation complexe peut résulter de la présence des MFC au sein du gel pectique.

Cet essai ne permet pas de conclure à une différence claire entre les trois compositions mais il met en avant le comportement viscoélastique complexe de ces matériaux biomimétiques.

I.2.b Fluage

Afin de compléter les essais de relaxation, n'ayant pas montré de différence claire de comportement viscoélastique entre les matériaux, des essais de fluage sont réalisés. L'essai de fluage est particulièrement pertinent dans cette étude car il est représentatif de ce que peut subir une paroi végétale. En effet, cette dernière est soumise à une pression interne, la pression de turgescence et connaît en conséquence un allongement, notamment lors de la croissance cellulaire. Grâce à la praticité

expérimentale des essais de fluage, plusieurs répétitions sont réalisées pour chaque matériau, dans le but d'identifier d'éventuelles différences significatives sur leur réponse mécanique.

1.2.b.i Module de fluage

Un essai de fluage est comparable à celui de relaxation des contraintes. En revanche, ici, une contrainte constante de traction σ_0 est appliquée à l'échantillon. L'évolution de la déformation $\varepsilon(t)$ avec le temps est mesurée. Des essais courts d'environ 50 minutes et des essais longs de 12 heures sont réalisés.

La fonction de fluage, permettant de normaliser la déformation, est analysée (Figure 5.2) :

$$F(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma_0} \quad [5.2]$$

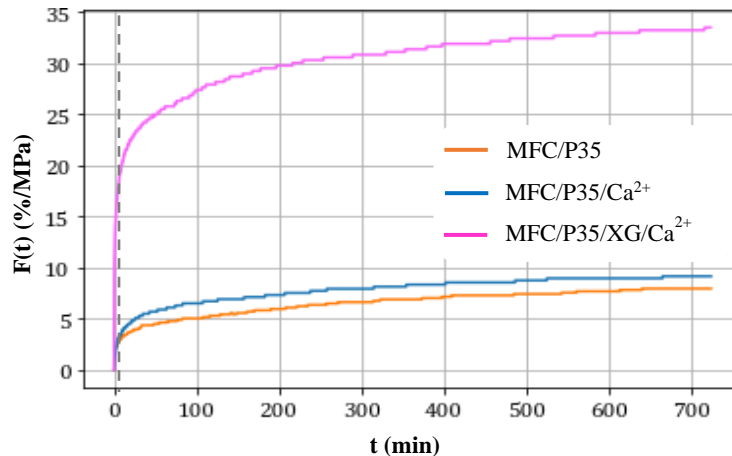


Figure 5.2 : courbes de fluage des trois matériaux. La limite entre le fluage primaire et le fluage secondaire est illustrée par la ligne en pointillés.

La courbe du matériau contenant du xyloglucane est distinctivement supérieure aux deux autres. Cela s'explique tout d'abord par la différence de rigidité entre les matériaux (Tableau 5.2). En effet, le matériau avec du xyloglucane étant presque trois fois moins rigide, sa déformation élastique est environ trois fois plus grande pour la même contrainte. La courbe se retrouve alors au-dessus des deux autres, correspondant aux matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ qui ont un module élastique proche.

De plus, d'un point de vue expérimental, l'identification de la longueur initiale de l'échantillon est peu précise. En effet, elle dépend par exemple du temps entre la mise en tension de l'échantillon et la première photo prise par l'appareil. Le protocole nécessite d'être amélioré car cette variation impacte notamment les valeurs de module de fluage et le décalage entre les courbes.

1.2.b.ii Vitesse de déformation

Pour ces raisons, il est plus judicieux de s'intéresser à la vitesse de déformation, dans le but de comparer les propriétés viscoélastiques et plastiques des matériaux. Au départ, le matériau se déforme presque instantanément, de manière élastique. Cela correspond au fluage primaire (Figure 5.2) qui dépend essentiellement du module élastique. La deuxième partie de la courbe est appelée fluage secondaire et est caractérisée par la vitesse de déformation.

Pour ces matériaux, la vitesse diminue au cours du temps (Figure 5.3).

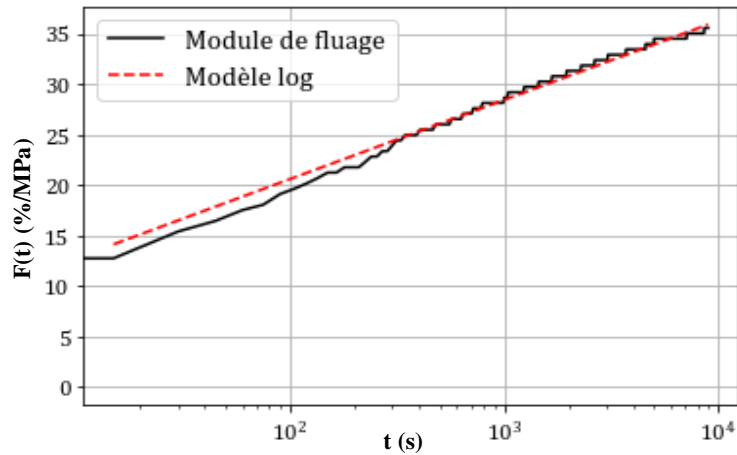


Figure 5.3 : allure d'une courbe de fluage en échelle logarithmique.

Une régression linéaire n'est donc pas adaptée pour l'identifier. Une fonction logarithmique permet de décrire l'évolution du module de façon efficace.

$$F(t) = a * \log(t) \quad [5.3]$$

La pente de cette droite, nommée a , est alors directement liée à la vitesse de déformation de l'échantillon. Ce paramètre est comparé pour les trois matériaux étudiés (Figure 5.4).

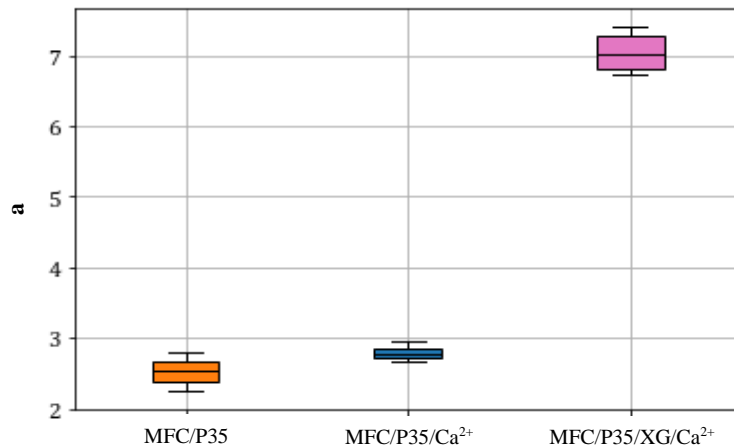


Figure 5.4 : comparaison du paramètre a des trois matériaux.

Le paramètre a est significativement supérieur pour le matériau contenant du xyloglucane. On peut donc conclure que ce dernier se déforme plus rapidement lors d'un essai de fluage. Il semble avoir un comportement plus viscoélastique ou plastique que les deux autres, qui eux ne sont pas distinguables.

1.2.b.iii Effet d'une modification enzymatique du matériau sur la vitesse de fluage

L'effet d'une enzyme de déméthylation des pectines, AaPME, sur des matériaux biomimétiques a été étudié dans le chapitre 4. Il a été observé que les modifications structurales des pectines menaient à une rigidification des matériaux grâce à la création de sites de jonctions calciques supplémentaires.

L'essai de fluage peut être un bon moyen d'observer ces modifications en temps réel. Une preuve de concept a donc été réalisée en suivant le fluage d'un matériau contenant des pectines de DM 52% (MFC/P52) immergé en présence ou non de AaPME (Figure 5.5).

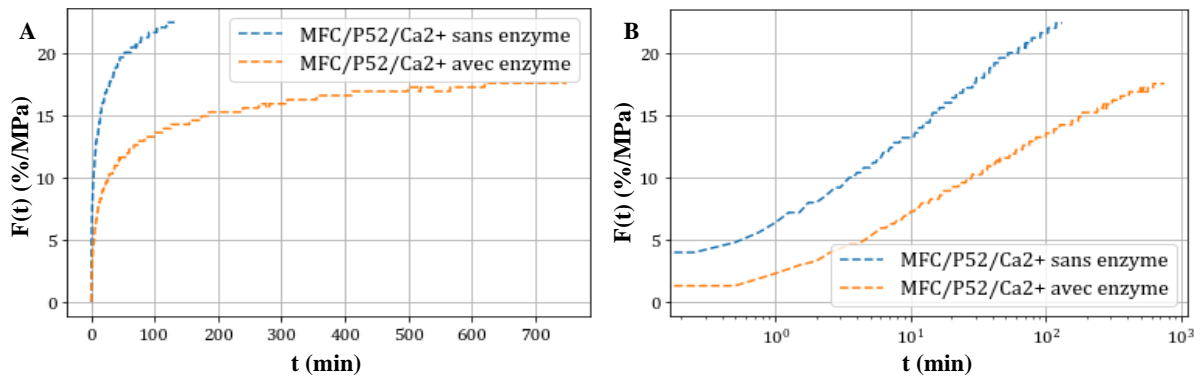


Figure 5.5 : courbes de fluage des matériaux MFC/P52 avant et après réaction avec AaPME. Représentation classique (A) et avec une échelle logarithmique (B).

En absence d'enzyme, le matériau casse rapidement. Les courbes logarithmiques permettent cependant d'observer que la vitesse de fluage secondaire est plus faible pour le matériau mis en présence de AaPME (Tableau 5.3).

Tableau 5.3 : comparaison des vitesses de déformation $\dot{\epsilon}$ avec ou sans AaPME.

Vitesse de déformation	Sans enzyme	Avec enzyme
$\dot{\epsilon}$	7,9	5,4

On peut remarquer que le matériau MFC/P52 non modifié par l'enzyme flue à une vitesse équivalente à celle du matériau MFC/P35/XG.

Les modifications engendrées par la PME modifie le comportement du matériau au cours de l'essai. Le fluage semble être une méthode intéressante pour suivre l'évolution des propriétés en temps réel de matériaux modifiés par voie enzymatique. Ces résultats nécessitent cependant d'être complétés.

L'essai de fluage permet donc de comparer les caractéristiques élasto-visco-plastiques des matériaux de compositions différentes et de suivre directement des modifications de structures comme celles résultantes de modifications enzymatiques. Les conditions de nos essais ne permettent cependant pas de dissocier le fluage dû à un allongement plastique irréversible ou un allongement viscoélastique réversible.

I.3 Caractérisation de la viscoplasticité par traction cyclique

Pour mettre en évidence la plasticité du matériau, des essais de traction cyclique sont réalisés. 10 cycles de traction consécutifs sont appliqués au matériau. Ensuite, après 30 minutes de repos, un 11ème cycle est réalisé. Dans la suite de cette partie, le numéro du cycle est noté n , avec $n \in [1, 11]$. La valeur de déformation appliquée au matériau à chaque cycle, est notée ϵ_{\max} et est constante au cours de chaque essai.

I.3.a Analyse du matériau MFC/P35/Ca²⁺

On s'intéresse premièrement à la description d'un essai pour le matériau MFC/P35/Ca²⁺. La Figure 5.6 montre les cycles contrainte-déformation obtenus pour ce matériau.

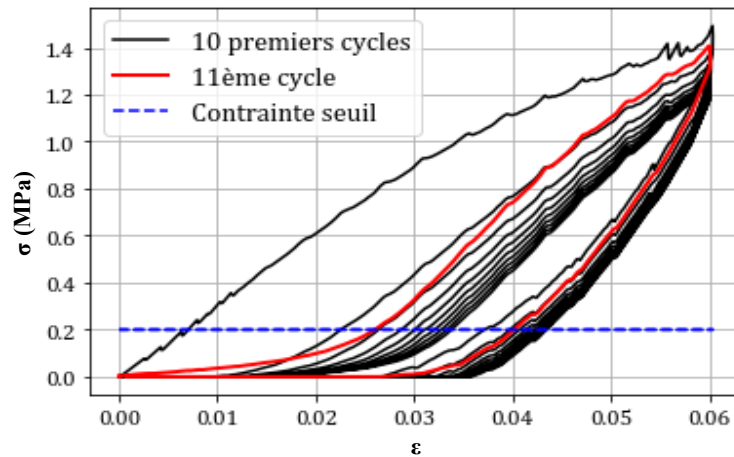


Figure 5.6 : cycles contrainte-déformation du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Ces cycles permettent d'extraire plusieurs informations. D'abord, il faut noter que le module d'élasticité n'est pas constant et augmente légèrement avec le nombre de cycles, comme observé dans la Figure 5.7.

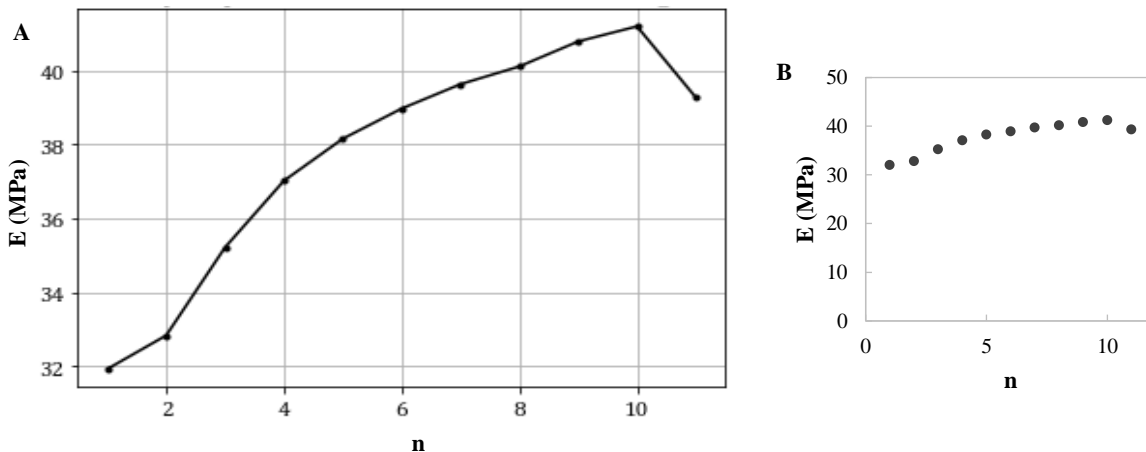


Figure 5.7 : évolution du module d'Young au cours des cycles. Changement d'échelle entre A et B.

Une réorganisation du matériau au cours des sollicitations peut en être à l'origine, avec un alignement des microfibrilles de cellulose qui renforcerait la structure dans la direction de traction par exemple. Lors du dernier cycle, après l'attente de 30 minutes, le matériau semble avoir relaxé et voit sa rigidité légèrement diminuer.

Ensuite, on observe que la contrainte maximale atteinte pour déformer l'échantillon de 6% diminue à chaque cycle. La force nécessaire pour déformer le matériau de la même façon à chaque cycle devient donc moins importante.

Enfin, en observant le retour du cycle à contrainte nulle, on peut noter que la déformation ne revient pas à 0 comme ce serait le cas pour un matériau purement élastique. Cette déformation résiduelle augmente avec le nombre de cycles.

La déformation résiduelle se retrouve au cours de la charge du cycle suivant : il sera nécessaire de déformer plus l'échantillon pour atteindre une contrainte seuil. Pour comparer les cycles, une contrainte seuil σ_{seuil} à 0,2 MPa est fixée. C'est la valeur minimale permettant d'être dans la partie linéaire des cycles, pour chaque essai, et qui permet d'éviter le flambage du matériau par exemple. La déformation ϵ_{seuil} correspondant à σ_{seuil} est tracée en fonction du cycle (Figure 5.8).

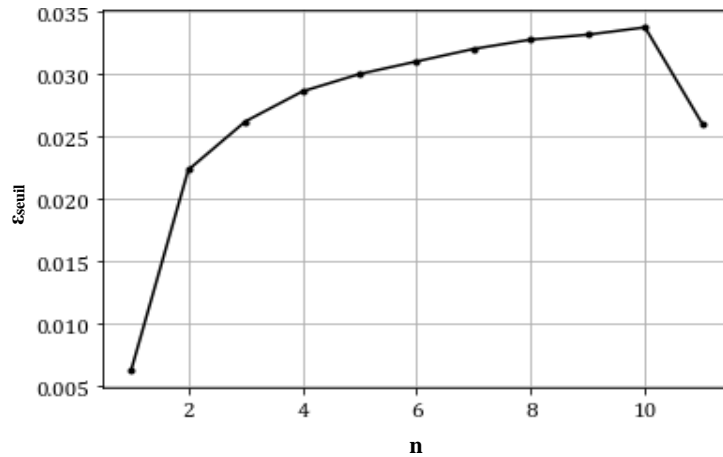


Figure 5.8 : évolution de la déformation à une contrainte seuil $\sigma_{seuil} = 0,2 \text{ MPa}$ au cours des cycles.

On remarque une grande différence entre le 1^{er} et le 2^{ème} cycle, s'expliquant par le fait que la déformation seuil du 1^{er} cycle correspond uniquement à une déformation élastique. A partir du 2^{ème} cycle, les composantes plastique et viscoélastique s'ajoutent. De plus, la déformation seuil diminue lors du dernier cycle, car une partie de la déformation viscoélastique s'est relaxée en 30 minutes.

I.3.b Évaluation des contributions élasto-viscoplastiques par analyse des déformations résiduelles

La comparaison des déformations résiduelles de plusieurs cycles peut permettre d'extraire une contribution plastique et une contribution viscoélastique.

I.3.b.i Méthodologie

Pour chaque cycle n , la déformation $\varepsilon_{seuil}(n)$ est notée lorsque σ_{seuil} est atteint. Cette déformation peut être décomposée en une partie élastique instantanée et une partie résiduelle :

$$\varepsilon_{seuil}(n) = \varepsilon_{el} + \varepsilon_{res}(n) \quad [5.4]$$

Pour simplifier cette analyse, on suppose que le module d'Young E est constant. On peut alors déterminer ε_{el} par :

$$\varepsilon_{el} = \frac{\sigma_{seuil}}{E} \quad [5.5]$$

La déformation résiduelle peut encore être décomposée en une partie plastique non recouvrable et une partie viscoélastique réversible :

$$\varepsilon_{res}(n) = \varepsilon_{ve}(n) + \varepsilon_p \quad [5.6]$$

Au final, on a, $\forall n \geq 2$:

$$\varepsilon_{seuil}(n) = \varepsilon_{el} + \varepsilon_p + \varepsilon_{ve}(n) \quad [5.7]$$

Cette décomposition est illustrée sur la figure suivante pour le cycle $n = 2$.

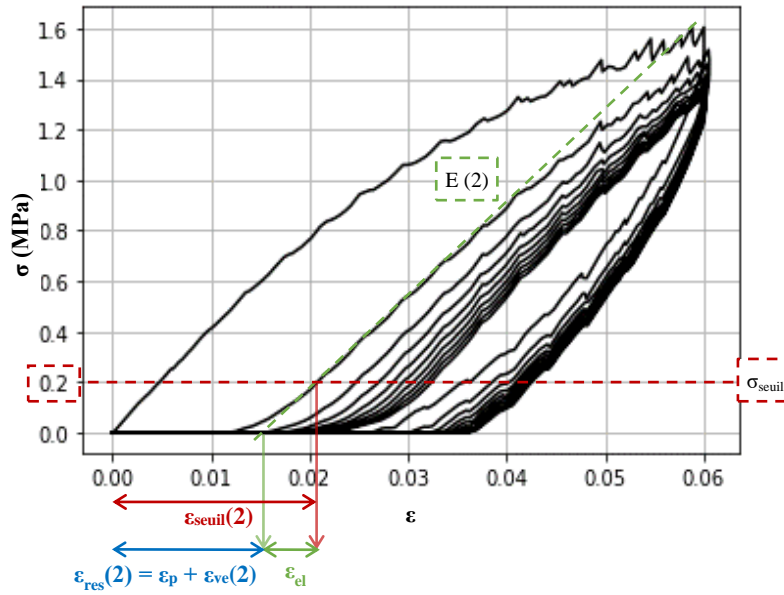


Figure 5.9 : illustration de la décomposition de la déformation ε_{seuil} à une contrainte seuil $\sigma_{seuil} = 0,2 \text{ MPa}$ pour le 2^{ème} cycle de traction.

On remarque que ε_{el} et ε_p ne dépendent pas du numéro de cycle n . En effet, la déformation élastique dépend uniquement de la contrainte appliquée σ_{seuil} et du module E . La déformation plastique ne varie pas non plus, pour $n \geq 2$, car elle dépend de la déformation maximale atteinte, qui est constante dans ce type d'essai. Aussi, pour le premier cycle, $\varepsilon_{seuil}(1) \approx \varepsilon_{el}$ car il n'y a pas de déformations résiduelles lors de la première montée à σ_{seuil} .

La déformation résiduelle, ε_{res} , du dernier cycle est utilisée afin de déterminer ε_p . En effet, si on attend pendant un temps suffisamment long avant de réaliser le dernier cycle, la déformation viscoélastique disparaît : $\lim_{t \rightarrow \infty} \varepsilon_{ve}(t) = 0$, avec t le temps de relaxation.

Ici, le 11^{ème} cycle de chargement est réalisé après 30 minutes de relaxation, ce qui n'est pas suffisant pour relaxer la totalité de la déformation viscoélastique. Cependant, les essais de relaxation de contraintes réalisés précédemment permettent d'estimer à 65% la relaxation des contraintes totales après 30 min. L'approximation suivante est alors utilisée :

$$\varepsilon_{ve}(11) = \frac{1}{3} \varepsilon_{res}(11) \quad [5.8]$$

$$\varepsilon_p = \frac{2}{3} \varepsilon_{res}(11) \quad [5.9]$$

Il est donc supposé qu'un tiers des déformations résiduelles du 11^{ème} cycle sont viscoélastiques, c'est-à-dire réversibles après un certain temps, et que deux tiers sont plastiques, et donc permanentes.

Au final, à partir des équations [5.7] et [5.9], on peut écrire :

$$\varepsilon_{ve}(n) = \varepsilon_{seuil}(n) - \varepsilon_{el} - \frac{2}{3} \varepsilon_{res}(11) \quad [5.10]$$

Ces équations permettront de comparer les déformations plastiques et viscoélastiques des différents matériaux.

Dans la suite de cette partie, différentes valeurs de déformation sont donc comparées entre elles afin d'estimer les contributions viscoélastiques et plastiques des matériaux :

- ϵ_p , la déformation plastique, qui est constante pour chaque cycle.
- $\epsilon_{ve}(10)$, la déformation viscoélastique au 10^{ème} cycle. Ce cycle est choisi car c'est lors de ce dernier que la déformation viscoélastique est la plus importante.
- $\epsilon_{ve}(10)/\epsilon_p$ le rapport des deux.

I.3.b.ii Résultats

Les valeurs de déformations plastiques ϵ_p , de déformations viscoélastiques au 10^{ème} cycle $\epsilon_{ve}(10)$ et les rapports de ces deux valeurs sont comparés dans les figures suivantes pour les trois matériaux.

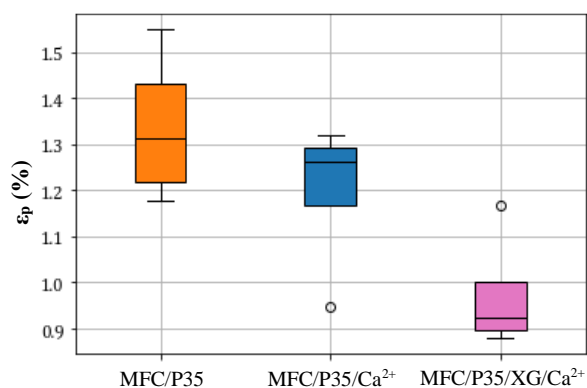


Figure 5.10 : comparaison des déformations plastiques ϵ_p .

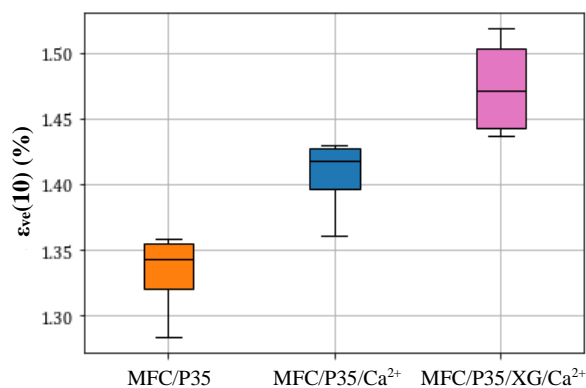


Figure 5.11 : comparaison des déformations viscoélastiques $\epsilon_{ve}(10)$.

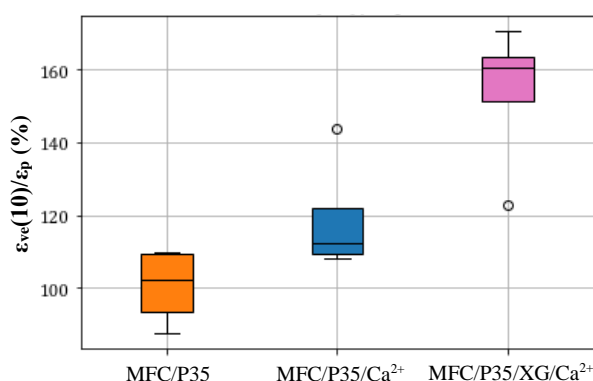


Figure 5.12 : comparaison des rapports de la déformation plastique sur la déformation viscoélastique au cycle 10.

Ces résultats mettent en évidence que la viscoélasticité contribue significativement plus que la plasticité à la déformation du matériau contenant du xyloglucane par rapport aux deux autres. Aussi, le matériau MFC/P35/Ca²⁺ semble également avoir une contribution viscoélastique légèrement supérieure à la contribution plastique par rapport au matériau MFC/P35.

On peut donc supposer que l'ajout de xyloglucane réduit la plasticité au profit de la viscoélasticité. La plasticité peut en partie résulter du réarrangement des microfibrilles de cellulose lors de l'étirement de l'échantillon. La présence de xyloglucane assurant des jonctions entre MFC peut mener à rendre certains de ces réarrangements réversibles.

L'ajout d'ions Ca²⁺ dans la composition pourrait avoir un effet similaire, mais moins prononcé. Une organisation différente du gel pectique pourrait également limiter des réarrangements irréversibles des macromolécules.

On peut aussi analyser ces essais cycliques en comparant les énergies nécessaires pour déformer le matériau.

I.3.c Évaluation des contributions élasto-viscoplastiques par analyse de l'énergie dissipée

Pour compléter l'analyse de la déformation résiduelle, les essais cycliques sont étudiés d'un point de vue énergétique.

I.3.c.i Méthodologie

L'aire sous une courbe de charge (zones 1+2) (Figure 5.13) correspond à une énergie de déformation fournie au matériau ($E_{fournie}$). L'aire sous la courbe de décharge (zone 2) correspond à l'énergie restituée par le matériau ($E_{restituée}$).

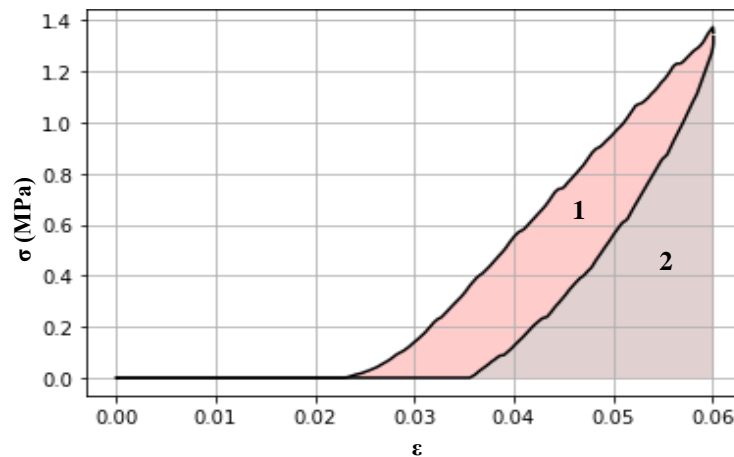


Figure 5.13 : illustration des aires considérées pour l'analyse énergétique d'un cycle de traction.

La différence entre les deux est la perte d'énergie (zone 1) et est notée ΔE .

$$\Delta E = E_{fournie} - E_{restituée} = E_1 \quad [5.11]$$

La perte d'énergie est due à une dissipation en chaleur causée par la friction entre les chaînes moléculaires. Elle peut être la marque de la plasticité ou de la viscoélasticité. L'élasticité pure ne dissipe pas d'énergie. La perte d'énergie ΔE est tracée en fonction du numéro de cycle n (Figure 5.14).

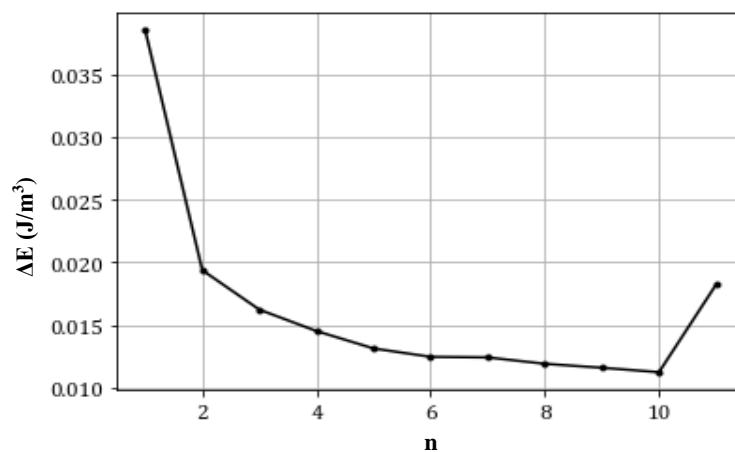


Figure 5.14 : évolution de la perte d'énergie ΔE avec le nombre de cycle de traction n pour le matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Le 1^{er} cycle est celui où il y a la plus grande perte d'énergie. En effet, en plus de la déformation viscoélastique, la déformation plastique est générée et dissipe beaucoup d'énergie. À partir du 2^{ème} cycle,

la perte d'énergie s'explique uniquement par la viscoélasticité. L'équation suivante est utilisée pour estimer la perte d'énergie due à la plasticité :

$$\Delta E_{plastique} = \Delta E(1) - \Delta E(2) \quad [5.12]$$

Cette relation suppose que la perte d'énergie due à la viscoélasticité ne varie pas entre ces deux cycles.

Les matériaux ayant des différences de rigidité, les énergies doivent être normalisées par l'énergie fournie pour le déformer. Les pertes d'énergies normalisées par l'énergie fournie sont donc comparées :

$$\frac{\Delta E}{E_{fournie}} \quad [5.13]$$

Un matériau purement élastique, ne dissipant pas d'énergie, aura un ratio de 0 et au contraire, un matériau purement visqueux, dissipera toute l'énergie reçue et ce ratio vaudra 1.

On remarque ensuite que la perte d'énergie croît au 11^{ème} cycle. Après 30 minutes de repos, le matériau a relaxé et s'est réorganisé. Une quantité supérieure d'énergie est alors dissipée pour atteindre la déformation maximale. Afin de quantifier l'impact de la pause de 30 minutes entre le 10^{ème} et le 11^{ème} cycle, l'évolution de la quantité d'énergie dissipée est évaluée :

$$\Delta E_{relaxation} = \frac{\Delta E(11) - \Delta E(10)}{\Delta E(10)} \quad [5.14]$$

Ces différences énergétiques sont comparées pour les trois matériaux.

1.3.c.ii Résultats

On s'intéresse dans un premier temps à l'énergie dissipée au deuxième cycle, normalisée par l'énergie fournie (Figure 5.15), car c'est le premier cycle durant lequel l'énergie dissipée est uniquement due à la viscoélasticité.

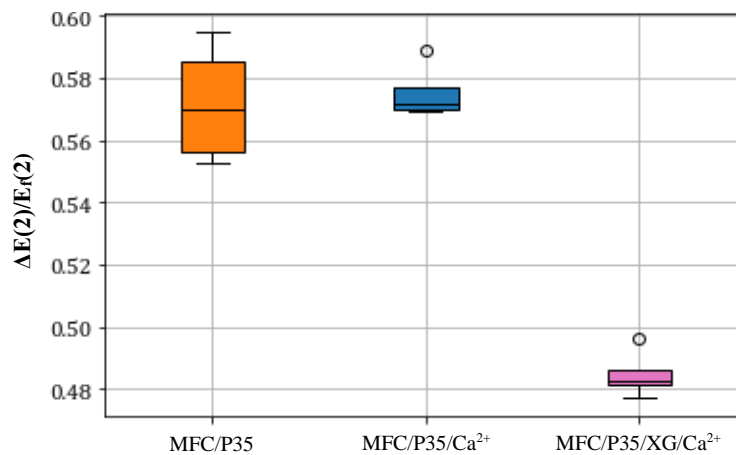


Figure 5.15 : comparaison de l'énergie dissipée au 2^{ème} cycle $\Delta E(2)$ normalisée par l'énergie fournie ($E_f(2)$).

Le matériau contenant du xyloglucane dissipe significativement moins d'énergie relativement à l'énergie fournie, par rapport aux deux autres matériaux. Ce comportement peut résulter de temps caractéristiques de relaxation différents de ce matériau par rapport aux deux autres.

Lorsqu'on s'intéresse à la perte d'énergie due à la plasticité, on remarque que les trois matériaux ont des comportements proches (Figure 5.16). Il n'y a pas de différence significative sur leur dissipation d'énergie plastique.

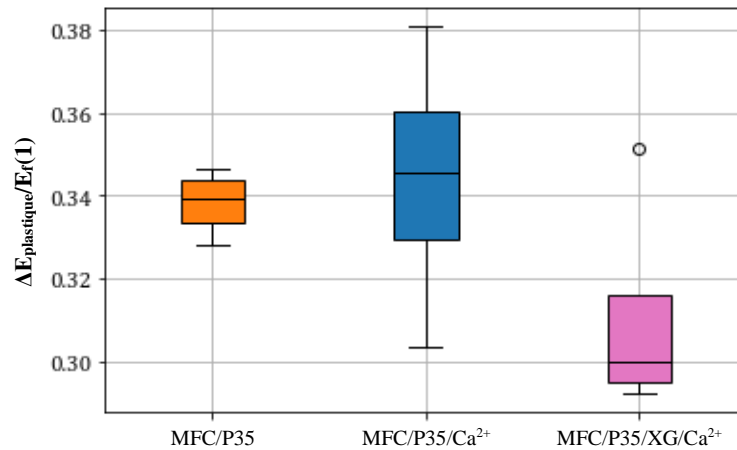


Figure 5.16 : comparaison de l'énergie dissipée par plasticité $\Delta E_{plastique}$ normalisée par l'énergie fournie ($E_f(1)$).

Enfin, on observe une distinction claire entre les matériaux pour l'analyse de la différence d'énergie due à la relaxation du matériau (Figure 5.17). Cela signifie que le matériau contenant du xyloglucane se réorganise plus rapidement que les deux autres matériaux car il faut fournir plus d'énergie pour le déformer à nouveau au 11^{ème} cycle. Cela confirme qu'il observe des temps de relaxation caractéristiques différents.

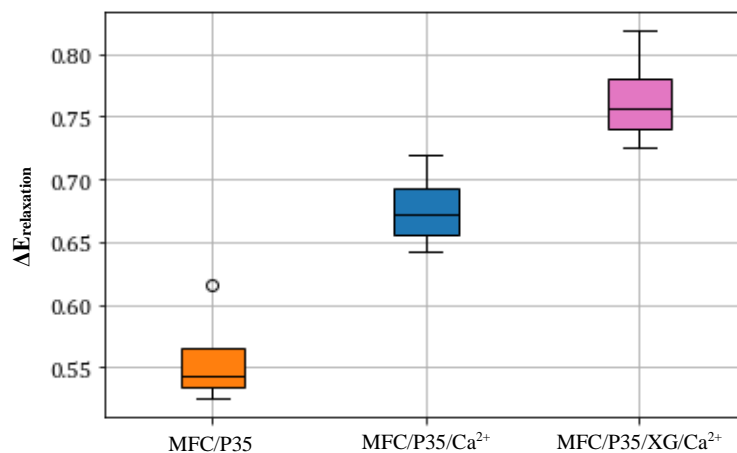


Figure 5.17 : comparaison de l'énergie dissipée après un temps de relaxation de 30 min $\Delta E_{relaxation}$.

D'après cette analyse sur les énergies, le matériau contenant du xyloglucane semble dissiper moins d'énergie par viscoélasticité lors de sa déformation et se relaxer plus rapidement que les deux autres. Cependant ces analyses sont difficiles à interpréter et l'effet de l'éventuelle réorganisation des MFC sur l'énergie dissipée n'est pas connu et pourrait fausser ces interprétations.

Il serait nécessaire de réaliser d'autres essais, en faisant varier la déformation maximale des cycles par exemple, pour vérifier si cette tendance se confirme.

I.4 Synthèse

Les propriétés viscoélastiques des matériaux ont d'abord été évaluées grâce aux essais de relaxation et de fluage. Avec ces caractérisations, on a pu observer que les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ n'ont pas un comportement significativement différent. En revanche, le matériau contenant du xyloglucane se déforme plus rapidement.

Les analyses sur les essais de traction cyclique permettent de distinguer les contributions plastique et viscoélastique des matériaux.

Les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ ont des comportements proches et l'ajout d'ions calcium dans la composition initiale n'a pas un impact significatif. En revanche, le matériau contenant du xyloglucane se comporte différemment. Selon l'analyse sur la déformation, celle-ci serait davantage liée à des phénomènes viscoélastiques réversibles que plastiques en comparaison des deux autres matériaux.

L'analyse énergétique des essais cycliques mène à des conclusions supplémentaires : le matériau contenant du xyloglucane dissipe moins d'énergie par viscoélasticité et semble être caractérisé par des temps de relaxation plus courts par rapport aux matériaux ne contenant pas de xyloglucane. Ces observations semblent cohérentes avec les résultats obtenus par essai de fluage.

Les analyses sur les essais cycliques nécessitent de poser des hypothèses fortes qui peuvent engendrer plus d'approximations, contrairement aux analyses de relaxation et de fluage qui permettent l'observation directe des propriétés des matériaux.

En conclusion, l'introduction du xyloglucane dans la composition du matériau, en plus de modifier son comportement élastique, a un impact significatif sur ses propriétés viscoélastiques et plastique.

Les comportements viscoélastiques des matériaux sont souvent décrits par des modèles basés sur des éléments structuraux des matériaux. L'application de ce type de modèle aux caractérisations présentées dans cette partie pourrait permettre de mettre en relation les données expérimentales avec des paramètres physiques. Il serait alors également possible de comparer les matériaux biomimétiques grâce à ces paramètres.

II. Modélisation des propriétés

Pour simuler la réponse d'un matériau à une sollicitation, on peut construire des modèles mécaniques. Dans cette étude, les modèles permettent d'apporter des éléments de compréhension supplémentaires des différents phénomènes ayant lieu lors de la sollicitation des matériaux biomimétiques.

Des modèles plus ou moins complexes combinent les phénomènes rhéologiques élémentaires : l'élasticité modélisée par un ressort, la viscoélasticité modélisée par un piston et la plasticité modélisée par un patin. Ces modèles permettent de caractériser le comportement de matériaux viscoélastiques. Les modèles rhéologiques les plus simples pour caractériser la viscoélasticité sont dans un premier temps appliqués à nos essais de relaxation de contrainte et de fluage. Des modèles plus élaborés, intégrant la plasticité ou des phénomènes viscoélastiques multiples, sont ensuite testés.

Cependant, ces modèles, aussi complexes qu'ils puissent être, restent des simplifications du réel. Ils permettent surtout de comprendre les phénomènes en jeu et leur relation.

II.1 Modèles rhéologiques classiques

Les modèles de Kelvin-Voigt, Maxwell et Zener sont classiquement utilisés pour caractériser le comportement viscoélastique de matériaux.

Le modèle de Kelvin-Voigt est constitué d'un ressort et d'un amortisseur en parallèle. Il est une première approximation du comportement de matériaux viscoélastiques en fluage. Le modèle de Maxwell comprend un ressort et un amortisseur en série. Ce modèle convient pour modéliser les essais de relaxation. Le modèle de Zener est composé d'un modèle de Maxwell avec un ressort en parallèle. C'est le modèle le plus simple pouvant caractériser à la fois la relaxation et le fluage.

Ces trois modèles sont trop simples pour caractériser le comportement viscoélastique des matériaux biomimétiques car il est impossible de faire correspondre les équations des modèles avec les données expérimentales (Figure 5.18, Figure 5.19, Figure 5.20).

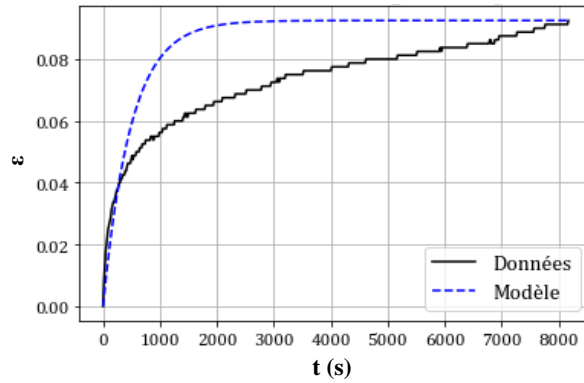


Figure 5.18 : comparaison du modèle de Kelvin-Voigt avec les données de fluage du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

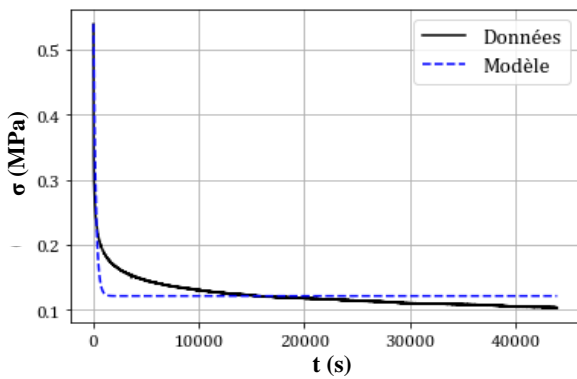


Figure 5.19 : comparaison du modèle de Maxwell avec les données de relaxation du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

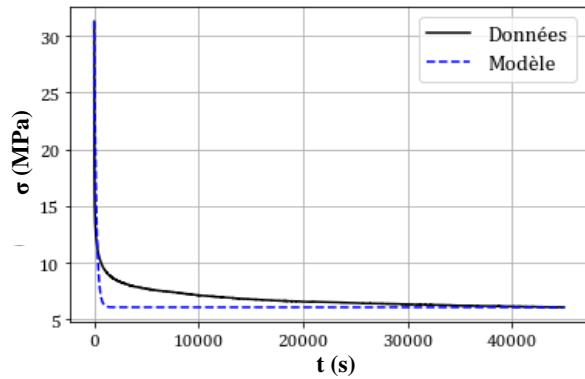


Figure 5.20 : comparaison du modèle de Zener avec les données de relaxation du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles intégrant des éléments plus complexes pour obtenir une description plus fidèle du comportement de nos matériaux.

II.2 Modèle de Bingham généralisé

Le modèle de Bingham généralisé (Bingham, 1916) est l'un des modèles rhéologiques élasto-viscoplastiques les plus simples.

II.2.a Principe

Dans ce modèle, un ressort élastique, un piston visqueux et un patin plastique sont mis en parallèle, ce qui permet de représenter les trois comportements élémentaires. L'ajout d'un ressort en série permet de modéliser l'élasticité pure. Les équations comportementales de chaque élément sont représentées en Figure 5.21.

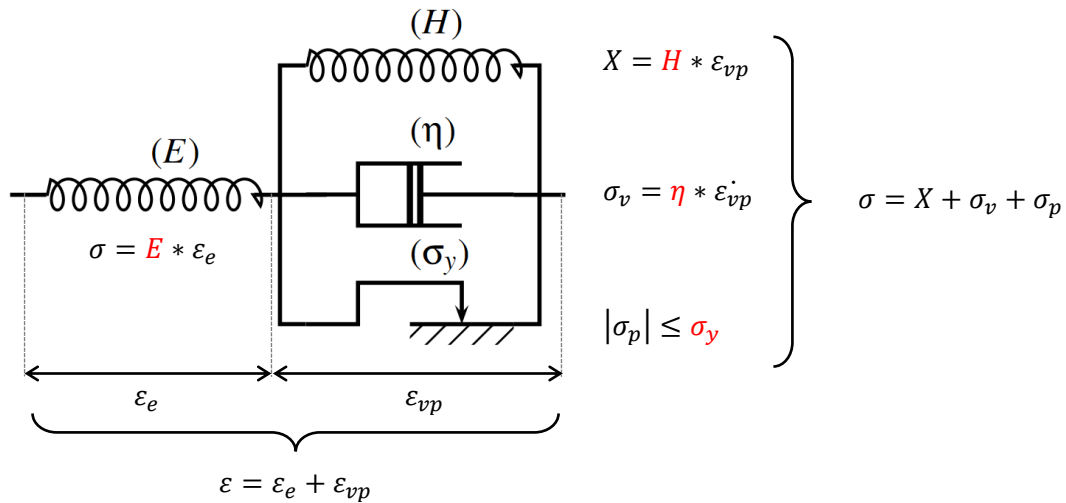


Figure 5.21 : schéma du modèle de Bingham généralisé.

En raison de l'assemblage en série, la déformation globale peut être décomposée en :

$$\varepsilon = \varepsilon_e + \varepsilon_{vp} \quad [5.15]$$

La déformation élastique, ε_e , est caractérisée par le ressort de module E . La déformation de la partie viscoplastique du modèle, ε_{vp} , est égale dans chacune des branches en parallèle.

Les contraintes des trois branches en parallèle peuvent être additionnées pour obtenir la contrainte totale, égale à la contrainte présente dans le ressort de la partie élastique :

$$\sigma = X + \sigma_v + \sigma_p = E * \varepsilon_e \quad [5.16]$$

Les trois branches en parallèle, caractérisées par la déformation ε_{vp} , ne se déforment que lorsque le patin plastique se déplace, c'est-à-dire seulement lorsque $|\sigma_p| = \sigma_y$. La plasticité conditionne le comportement visqueux : il ne peut pas y avoir de déplacement du piston si $|\sigma_p| = \sigma_y$.

Le détail des équations permettant de réaliser la modélisation est donné en annexe IV.5.

II.2.b Applications aux essais de relaxation

Le modèle de Bingham est également trop simple pour décrire correctement le comportement des matériaux lors d'essais de relaxation (Figure 5.22)

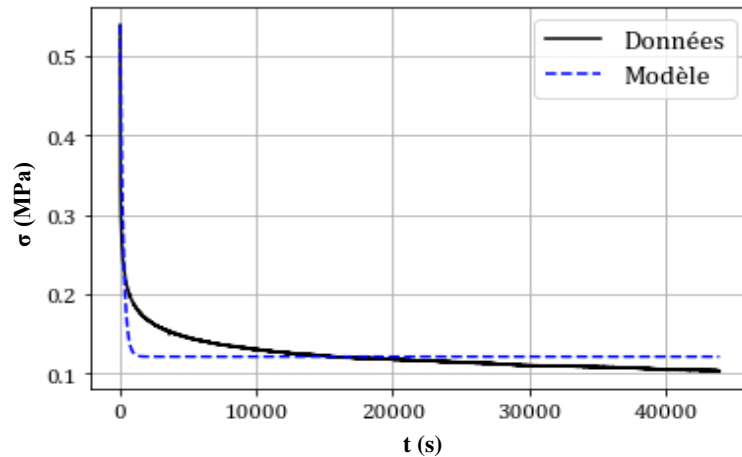


Figure 5.22 : comparaison du modèle de Bingham avec les données de relaxation des contraintes du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

En effet, comme pour le modèle de Maxwell, il ne contient qu'une seule branche pour représenter la viscosité. Or il semble nécessaire d'introduire plusieurs temps de relaxation pour représenter le comportement viscoélastique complexe de ce matériau.

II.3 Modèles incluant une distribution des temps de relaxation

Le modèle de Maxwell généralisé est une généralisation du modèle de Zener et est couramment utilisé en viscoélasticité pour représenter des comportements complexes. On s'intéresse également au modèle semi-empirique de Zsivanovits *et al.* (2004) qui a déjà été utilisé pour modéliser le comportement de gels de pectines.

II.3.a Modèle de Maxwell généralisé

Les modèles précédents étant insuffisants pour modéliser le comportement visqueux de nos matériaux dans des essais de relaxation et de fluage, le modèle de Maxwell généralisé est introduit. Ce modèle est constitué de plusieurs modèles de Maxwell en parallèle (Figure 5.23). Il fait donc intervenir plusieurs temps de relaxation, τ , correspondant au rapport de la viscosité sur le module de rigidité pour chaque branche du modèle.

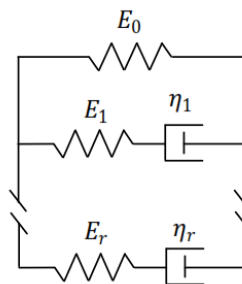


Figure 5.23 : schéma du modèle de Maxwell généralisé.

Un modèle de Maxwell généralisé avec 3 branches en parallèle est utilisé pour modéliser les essais de relaxation des matériaux. On observe pour un exemple dans la Figure 5.24 que le modèle peut s'approcher des données expérimentales.

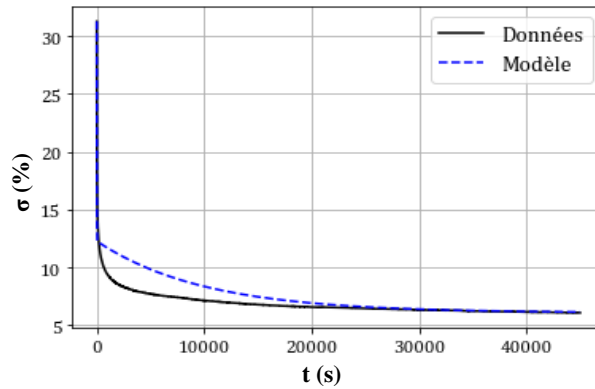


Figure 5.24 : comparaison du modèle de Maxwell généralisé à 3 branches avec les données de relaxation du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Le modèle serait de plus en plus adapté en augmentant le nombre de branches viscoélastiques. En revanche, le nombre de paramètres augmentant, ces derniers perdraient en significativité, car ils pourraient se compenser mutuellement.

II.3.b Modèle de Zsivanovits

Les matériaux biomimétiques, comme les parois végétales, ne se comportent pas comme des matériaux viscoélastiques classiques. Plusieurs études ont montré la complexité du comportement viscoélastique des parois et la nécessité de le caractériser par plusieurs temps de relaxation (Taiz, 1984; Yamamoto et al., 1970; Zsivanovits et al., 2004).

Le modèle de Zsivanovits *et al.* (2004) est une adaptation empirique du modèle de Maxwell en relaxation et est défini par :

$$\sigma(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)^\beta\right) \quad [5.17]$$

Le paramètre β permet de modifier l'allure de l'exponentielle et traduit une répartition des temps de relaxation. Ce modèle est efficace pour caractériser le comportement de nos matériaux comme montré dans la Figure 5.25.

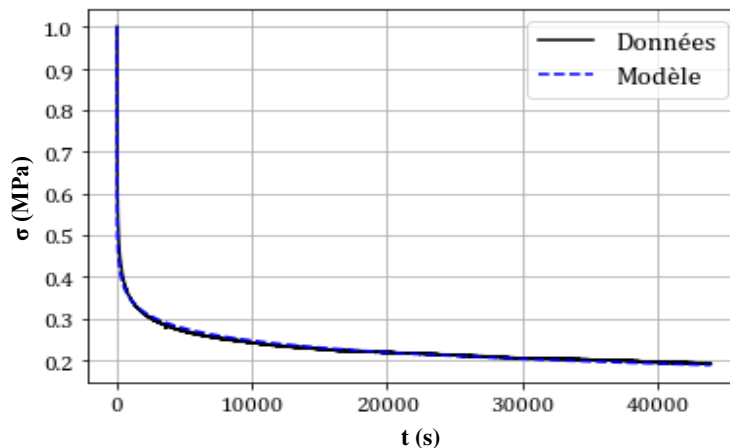


Figure 5.25 : comparaison du modèle de Zsivanovits avec les données de relaxation des contraintes du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Le tableau suivant récapitule les paramètres β et τ_0 pour chaque matériau.

Tableau 5.4 : paramètres permettant d'ajuster le modèle de Zsivanovits aux données de relaxation.

Matériau	β	τ_0 (s)
MFC/P35	0,110	340,5
MFC/P35/Ca ²⁺	0,089	144,9
MFC/XG/P35/Ca ²⁺	0,120	617,2

On remarque que le paramètre β est assez proche pour les 3 compositions, contrairement au temps de relaxation, τ_0 . Cela peut signifier qu'un nombre équivalent de phénomènes de relaxation à lieu pour les trois matériaux, mais que les temps caractéristiques de ces phénomènes ne sont pas du même ordre de grandeur.

La composition contenant du xyloglucane est celle qui a le temps de relaxation le plus élevé. Ce matériau met donc plus longtemps à relaxer complètement les contraintes lors d'essais longs.

En revanche, il est en réalité complexe de relier les valeurs de β et de τ_0 à d'éventuelles caractéristiques structurelles du matériau.

II.4 Modélisation des essais de traction avec le modèle de Bingham généralisé

Comme vu précédemment, le modèle de Bingham ne permet pas de décrire correctement des essais de relaxation car il ne contient pas assez de branches viscoélastiques permettant de décrire des phénomènes de relaxation s'étendant sur plusieurs heures. En revanche, grâce à l'intégration du patin plastique, il est adapté pour décrire le comportement des matériaux lors de sollicitations de courtes durées comme les essais de traction.

II.4.a Application du modèle à des essais de traction

Les paramètres du modèle sont d'abord ajustés pour un essai de traction à la rupture. Le modèle de Bingham est efficace pour représenter ces essais (Figure 5.26).

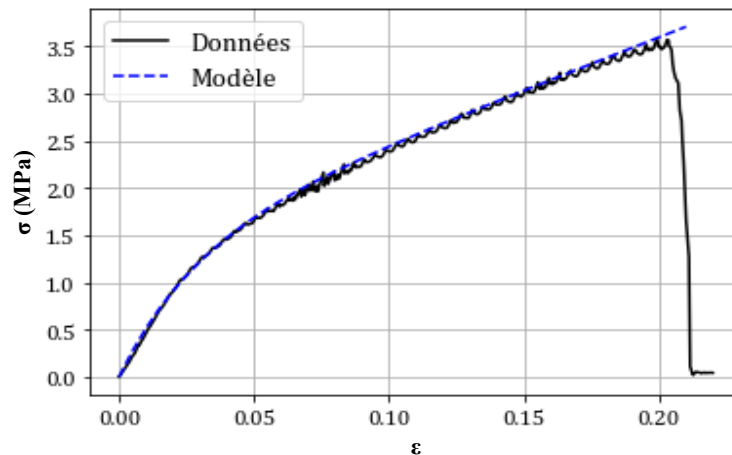


Figure 5.26 : comparaison du modèle de Bingham avec les données de traction à la rupture du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Cependant, il est possible d'obtenir un ajustement du modèle aux données expérimentales avec plusieurs combinaisons différentes des paramètres E , σ_y , H et η . Il est donc difficile de comparer les matériaux. Les modules E sont ajustés en accord avec ceux déterminés en partie I.1 *Propriétés en traction uniaxiale*. Un exemple de paramètres est donné pour chaque matériau dans le Tableau 5.5 et permet de mettre en avant les différences entre les matériaux avec et sans xyloglucane.

Tableau 5.5 : exemples de paramètres permettant d'ajuster le modèle de Bingham aux données de traction à la rupture.

Matériau	E (MPa)	H (MPa)	σ_y (MPa)	η (MPa.s)
MFC/P35	35	8	0,7	800
MFC/P35/Ca ²⁺	38	10	1,0	1100
MFC/XG/P35/Ca ²⁺	10	5	0,2	300

Pour le matériaux MFC/P35/Ca²⁺, on peut observer que la contrainte seuil de plasticité du modèle, σ_y , est cohérente avec la contrainte observée au niveau de l'inflexion de la courbe de traction (Figure 5.26), inflexion qui correspond généralement au début des réarrangements plastiques des matériaux. Ces faibles contraintes limites de plasticité montrent que des réarrangements structuraux irréversibles ont lieu même pour de faibles sollicitations.

La viscosité η nécessaire pour modéliser le comportement des matériaux est élevée, ce qui est cohérent avec la présence de MFC dans le gel de pectines.

Alors que les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ peuvent être modélisés avec un jeu de paramètre équivalent, le matériau avec du xyloglucane a un module E, une limite de plasticité σ_y et un paramètre de viscosité η plus faibles que les deux autres matériaux. Cela traduit son comportement globalement moins rigide.

On peut également calculer un temps de relaxation de la branche viscoélastique à partir de ces valeurs :

$$\tau = \frac{\eta}{H} \quad [5.18]$$

Pour les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ on obtient alors une valeur proche d'environ 100 s alors que pour le matériau contenant du xyloglucane, on obtient une valeur légèrement inférieure (60 s). Cela est en accord avec les conclusions issues de la partie I.3.c *Évaluation des contributions élasto-viscoplastiques par analyse de l'énergie dissipée*, sur des essais courts le matériau contenant du xyloglucane relaxe plus vite.

Les paramètres sont cependant interdépendants et on peut obtenir des allures de courbes similaires en diminuant σ_y et en augmentant η , par exemple. Il est donc difficile d'avoir une interprétation plus aboutie.

II.4.b Application aux essais cycliques

Pour les essais cycliques, ce modèle permet également de décrire correctement, avec le même jeu de paramètres, les charges et décharges du premier et deuxième cycle (Figure 5.27). Mais il devient de plus en plus imprécis lorsque le nombre de cycle augmente.

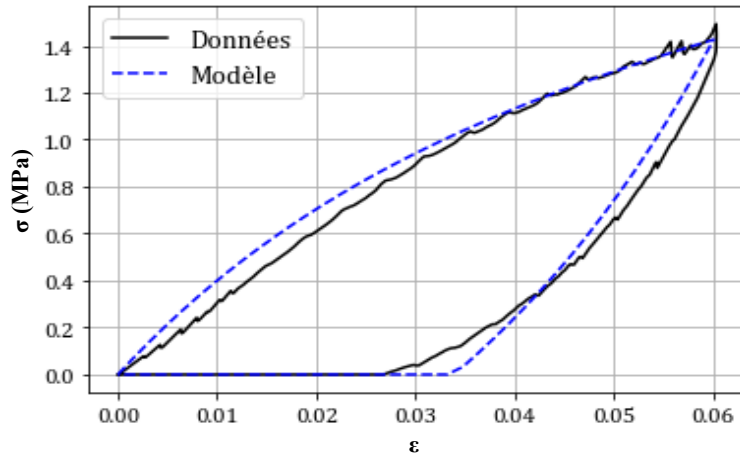


Figure 5.27 : comparaison du modèle de Bingham avec les données de traction du cycle 1 du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Aussi, comme pour les essais de traction à rupture, le jeu de paramètres modélisant l'essai n'est pas unique. Pour réduire les possibilités de compensation des paramètres entre eux, il serait nécessaire d'appliquer des contraintes sur les paramètres à partir des résultats d'autres analyses.

II.5 Synthèse

Des modèles de rhéologie permettant de caractériser la viscoélasticité et la plasticité des matériaux ont été comparés aux données expérimentales issues de la caractérisation des matériaux biomimétiques composés de MFC, de pectines faiblement méthylées et en présence ou non de xyloglucane.

Le comportement de ces matériaux ne peut pas être modélisé de façon simple car ils sont caractérisés par de nombreux temps de relaxation, traduisant les mécanismes complexes de réarrangement structuraux ayant lieu lors de leur sollicitation mécanique.

Ces temps de réarrangement s'étendant sur plusieurs décades peuvent être associés à des phénomènes coopératifs. On peut supposer que des réarrangements de cette nature ont lieu, comme par exemple une réorganisation des jonctions pectiques. Ce type de réarrangement est d'ailleurs proposé dans le modèle de croissance pariétale de Peaucelle *et al.* (2012).

Un modèle récent a également été envisagé pour la description des matériaux biomimétiques. Ce modèle rhéologique, combinant des ressorts, des pistons, ainsi qu'un nouvel élément, nommé « spring-pot », a récemment été introduit (Bonfanti *et al.*, 2020). Le « spring-pot » a un comportement intermédiaire entre un ressort élastique et un piston visqueux et son équation caractéristique est définie comme :

$$\sigma(t) = C_{\beta} * \frac{\partial^{\beta} \varepsilon(t)}{\partial t^{\beta}} \quad [5.19]$$

C_{β} est une constante dépendant du matériau. β correspond au nombre de fois qu' ε est dérivé. C'est un nombre réel compris entre 0 et 1. Si $\beta = 0$, alors l'équation décrit un comportement élastique pur. Si $\beta = 1$, alors le comportement décrit est totalement visqueux. Dériver une fonction un nombre réel de fois n'est pas standard en mathématiques et les méthodes employées sont détaillées dans l'article cité (Bonfanti *et al.*, 2020).

Ce nouvel élément « spring-pot » peut finalement être combiné avec d'autres pour former des modèles composés. On peut par exemple remplacer l'un des ressorts du modèle de Zener par un spring-pot, et ainsi obtenir le modèle du « Fractional Solid », présenté dans la publication de Bonfanti comme étant particulièrement efficace pour représenter le comportement de parois cellulaires.

Ces modèles semblent également efficaces pour représenter les résultats de nos essais. Cependant, l'identification des paramètres demande une puissance de calcul conséquente. Il faut donc veiller à

réduire le nombre de points de données des essais expérimentaux, et à limiter le nombre de spring-pots dans le modèle.

III. Conclusion du chapitre

Le comportement des matériaux a d'abord été évalué grâce à des essais de relaxations, de fluages et de tractions cycliques.

Ces essais ont montré que les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺ ont des caractéristiques équivalentes et l'ajout d'ions calcium dans la composition initiale n'a pas un impact significatif.

En revanche, le matériau contenant du xyloglucane réagit différemment aux sollicitations mécaniques. Il semble se déformer plus rapidement et en dissipant moins d'énergie par viscoélasticité. Lorsqu'on s'intéresse à la déformation résultant de la plasticité, celle-ci semble être moins importante que chez les matériaux ne contenant pas de xyloglucane. La présence de xyloglucane dans la composition semble donc modifier significativement l'organisation structurale du matériau.

L'application de modèles rhéologiques à ces caractérisations mécanique a ensuite été réalisée. Ces essais ont mis en avant le comportement viscoélastique complexe des matériaux. Il est en effet nécessaire de décrire leur viscoélasticité par une distribution des temps de relaxation, traduisant les mécanismes complexes de réarrangement structuraux. Ces temps s'étendent sur plusieurs heures et peuvent être associés à des phénomènes coopératifs, comme le réarrangement des jonctions physiques des pectines par le calcium.

Conclusion

Ce projet a tout d'abord permis de développer des matériaux biomimétiques de la paroi végétale. Ces matériaux sont constitués de microfibrilles de cellulose (MFC), de pectines et de xyloglucane et ils peuvent être hydratés afin de les caractériser dans des conditions analogues à celles d'une paroi végétale. Tout comme la paroi, les matériaux biomimétiques développés dans ce projet sont des matériaux composites complexes.

Dans le 3^{ème} chapitre, leur comportement hybride a pu être mis en avant : ce sont en effet des matériaux hydrogels renforcés par des fibres. Il a été aussi montré que leurs propriétés, après hydratation dans un milieu contenant du calcium, varient en fonction de nombreux paramètres interdépendants.

Pour une composition donnée, la phase aqueuse contrôle le gonflement ce qui influence également les propriétés mécaniques. En effet, les pectines forment un gel en présence de calcium en raison d'interactions physiques assurant la formation de jonctions de type « egg-box ». Or, ces gels sont de nature polyélectrolyte et des paramètres tels que la concentration en ions, leur nature, le volume de réhydratation ou la présence d'un co-soluté influencent leur gonflement. Des taux d'hydratation (environ 70%) et des modules élastiques d'un ordre de grandeur à ce qui est généralement décrit pour les parois végétales (quelques Méga Pascals) sont obtenus par réhydratation des matériaux dans une solution à 0,1 mol/L de calcium.

Des matériaux aux propriétés variées sont obtenus selon les conditions d'hydratation mais également selon la structure des pectines, et notamment selon leur degré de méthylation (DM), ou encore selon la composition en polysaccharides. La fraction volumique de MFC est un paramètre particulièrement important car elles assurent un rôle de charges renforçant l'hydrogel. Ce renforcement a pu être modélisé grâce à la combinaison du modèle d'Halpin-Kardos, décrivant le renfort de fibres courtes, et du modèle de Jones-Marques, traduisant les conséquences de l'enchevêtrement de fibres longues. Il serait intéressant de vérifier si ce modèle peut être appliqué quel que soit le DM des pectines.

Plusieurs de ces paramètres sont modulés par la cellule végétale afin d'assurer la croissance de la paroi. Un des aspects particulièrement étudié actuellement est la modification structurelle des pectines par des enzymes.

Le chapitre 4 s'est donc intéressé à la modification enzymatique des matériaux biomimétiques. Ces derniers semblent adaptés pour étudier le comportement d'enzymes de remodelage des pectines et faire le lien avec les effets observés *in planta*.

En effet, l'application d'une méthylestérase de pectines, la PME d'*Aspergillus aculeatus*, sur les matériaux biomimétiques permet de déméthyliser les pectines jusqu'à un DM d'environ 30%. La réaction sur les matériaux est plus lente que ce qui a pu être caractérisé pour des solutions de pectines car elle dépend de la cinétique de diffusion de l'enzyme au sein du matériau. Celle-ci n'a cependant pas été évaluée et il serait intéressant d'identifier si cette diffusion est en accord avec ce qui peut avoir lieu au sein d'une paroi végétale.

Dans un milieu contenant du calcium, cette déméthylation permet de former de nouvelles jonctions pectiques assurant une augmentation de l'ensemble des propriétés mécaniques des matériaux. Les propriétés semblent également dépendre du motif d'estérification des pectines car les matériaux dont les pectines sont modifiées jusqu'à un DM d'environ 30% ont des propriétés mécaniques très différentes des matériaux constitués initialement de pectines d'un DM équivalent (matériaux MFC/P35).

La réactivité de AaPME avec les matériaux biomimétiques en fonction de paramètres physico-chimiques du milieu réactif ou en fonction de la composition du matériau a également été étudiée. Seule une réduction significative du gonflement des matériaux, par ajout d'un co-soluté dans le milieu réactionnel, semble impacter la réaction, en relation avec la diffusion de l'enzyme. Des paramètres tel que le pH, la

concentration en calcium ou la composition en polysaccharide (avec un ratio constant de la quantité de PME par rapport à la quantité de pectines) n'ont pas montré d'effet significatif sur l'activité de AaPME dans ces conditions. Cela laisse supposer que l'activité de cette enzyme est gouvernée par la structure pariétale.

Des PME de différentes origines ainsi que des polygalacturonases ont aussi été appliquées avec succès sur les matériaux. Les conséquences observées sur les matériaux biomimétiques ont pu être comparées à celles observées suite à leur application sur *A. thaliana*.

Une autre PME fongique VdPME, a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus pour des modifications par AaPME. La différence de processivité entre AaPME et VdPME, identifiée sur des pectines solubilisées, n'a cependant pas pu être vérifiée sur les matériaux biomimétiques. Il serait nécessaire de faire varier des conditions expérimentales, telles que la durée de réaction et/ou la quantité d'enzyme pour le vérifier.

L'application d'une PG végétale, ADPG2, a également permis de modifier le matériau biomimétique. Certaines pectines ont été dégradées en oligomères ce qui a eu pour conséquence une diminution des propriétés mécaniques du matériau. Sur une durée de réaction plus courte, la PG semble par contre s'attaquer en priorité aux acides galacturoniques en dehors des jonctions pectiques, comme cela a été observé lors de la co-application de VdPME et d'ADPG2.

Des comparaisons ont été réalisées entre les conséquences observées dans ce chapitre et celles observées lors de l'application de ces enzymes sur des cultures d'*A. thaliana*, réalisées par le laboratoire BIOPI (partenaire de ce projet ANR). Pour les plantes, une réduction de la longueur de l'hypocotyle est observée à la fois suite à l'application d'une PME (VdPME) ou suite à l'application d'une PG (ADPG2). Lors de l'application de ces enzymes sur des parois biomimétiques, une rigidification est observée avec la PME, en raison de la complexation des pectines déméthylées avec le calcium. Avec la PG, une dégradation des pectines a lieu dans le matériau. Ces deux phénomènes peuvent être à l'origine d'une diminution de croissance des cellules d'hypocotyles.

Aussi, deux PG ayant la même activité en solution, ADPG2 et VPG1, semblent être impactées différemment selon le type de substrat. Elles ne produisent plus les mêmes effets lorsqu'elles sont appliquées à des matériaux biomimétiques et à des végétaux, VPG1 ne semblant pas active sur ces deux substrats.

Il est probable que les modifications structurales des pectines entraînent des modifications d'autres propriétés mécaniques telles que la viscoélasticité et la plasticité.

Le chapitre 5, s'est donc intéressé à décrire plus en détails ce type de propriétés pour des matériaux biomimétiques contenant des pectines faiblement méthylées.

Le comportement des matériaux a d'abord été évalué grâce à des essais de relaxation, de fluage et de traction cyclique. Ces essais ont montré que la présence de xyloglucane dans le matériau menait à des comportements viscoélastiques et plastiques différents des matériaux ne contenant pas de xyloglucane. Un matériau contenant du xyloglucane se déforme plus rapidement et en dissipant moins d'énergie par viscoélasticité. Sa déformation résultant de la plasticité est moins importante que dans les matériaux ne contenant pas de xyloglucane.

Ces conclusions ont été comparées à des données supplémentaires issues de la modélisation des propriétés mécaniques par des modèles rhéologiques. Il est nécessaire de décrire la viscoélasticité de ces matériaux par une distribution de temps de relaxation, traduisant les mécanismes complexes de réarrangement structuraux. Ces temps s'étendent sur plusieurs heures et peuvent être associés à des phénomènes coopératifs, comme le réarrangement des jonctions physiques des pectines par le calcium.

Ce projet a donc permis de répondre à plusieurs problématiques. Les matériaux développés peuvent être décrits comme des matériaux biomimétiques car leur composition, les interactions entre les constituants et leurs caractéristiques physico-chimiques et mécaniques sont très proches de ce qui est actuellement connu des parois végétales.

L'étude enzymatique réalisée est préliminaire mais ces matériaux semblent également être des objets d'intérêt pour étudier des enzymes de remodelage de la paroi, dans des conditions très analogues à celles rencontrées réellement par les enzymes. Les contraintes de diffusion des enzymes dans ces matériaux pourraient permettre de mieux comprendre des phénotypes végétaux complexes. Des paramètres supplémentaires pourraient être étudiés telles que l'influence de la cristallinité des MFC ou le rôle des ramifications RG des pectines.

Aussi, les interactions entre les polysaccharides et l'architecture de la paroi restent des thématiques de recherche actuelles et l'étude approfondie des propriétés de ces matériaux semble adaptée pour apporter des pistes de réflexion supplémentaires de façon plus accessible, d'un point de vue technique, que l'étude de parois végétales.

De façon concrète, ces matériaux biomimétiques semblent, par exemple, particulièrement pertinents pour étudier les mécanismes d'élongation de tubes polliniques. Ces derniers poussent en effet au sein d'une paroi primaire et cette croissance semble liée à la structure de cette paroi (Fobis-Loisy et Jaillais, 2021). Actuellement, la croissance pollinique est étudiée *in vitro* sur des milieux gélifiés de type agarose. Il est donc intéressant d'envisager de l'étudier sur ces modèles biomimétiques dont la structure est proche d'une paroi végétale et peut être modulée de différentes façons.

Enfin, ces matériaux pourraient également être intéressants pour des applications dans d'autres secteurs que la recherche en biologie végétale. En effet, les hydrogels sont particulièrement utiles pour développer des stratégies d'encapsulation de principes actifs. Des gels de pectines ont déjà été considérés pour cette application (Fathi et al., 2014) mais l'intégration de microfibrilles de cellulose constitue une avancée supplémentaire permettant de fournir des gels dont les propriétés peuvent facilement être modulées par la fraction volumique de MFC. Les propriétés pourraient également être modifiées grâce aux enzymes de remodelage des pectines. Des travaux sont en cours pour développer cet axe de recherche.

Chapitre 6 : Annexes

I. Mise au point d'un matériau autosupporté

La première année du projet a permis de développer un protocole de mise en œuvre des matériaux biomimétiques de la paroi cellulaire végétale sous forme de films autosupportés après réhydratation. Un ratio de 30% de MFC et 70% de pectines est choisi. Les 30% de MFC sont représentatifs des ratios de cellulose que l'on peut avoir dans une paroi végétale primaire, et comme on souhaite comprendre, dans un premier temps, le comportement des pectines dans ces matériaux, le reste de la composition est complété par des pectines.

I.1. Choix du type de MFC

Le choix du type de microfibrilles de cellulose et de leur purification se sont révélés être des paramètres majeurs dans l'obtention d'un matériau homogène macroscopiquement. Les MFC issus d'un procédé sulfite ont tendance à former des agrégats contrairement à des MFC issues d'un procédé kraft.

Les MFC krafts sont en fait recouvertes de xylanes, ce qui semble apporter une meilleure stabilité à la suspension. Des essais de traction sont réalisés sur des matériaux obtenus à partir des différents types de MFC, après réhydratation dans une solution à 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Les moyennes des modules d'Young obtenus pour 5 échantillons de chaque série sont reportées dans la figure suivante.

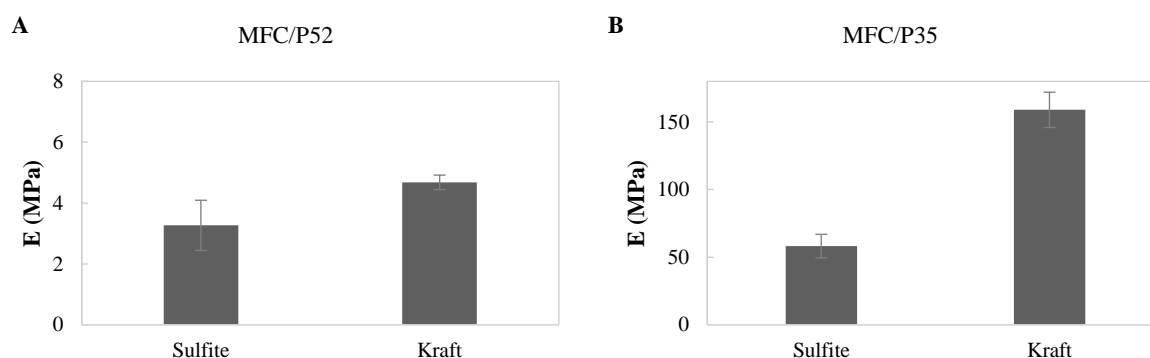


Figure 6.1 : comparaison des modules d'Young des matériaux MFC/P52 (A) ou MFC/P35 (B), selon le type de MFC utilisé. Matériaux réhydratés dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} .

L'obtention d'un matériau homogène se traduit par une augmentation du module d'Young. Cela est d'autant plus marqué pour les films composés de pectines P35.

Les matériaux constitués de MFC kraft sont aussi considérés comme plus représentatifs de la paroi cellulaire végétale car composés des 3 constituants majeurs, le xylane remplaçant le xyloglucane dans le rôle de l'hémicellulose. Il a été montré qu'environ 20% de xylane s'adsorbait sur les MFC (Falcoz-Vigne, 2016). Dans nos compositions constituées de 30% de MFC, nous avons donc en réalité 6% de xylanes et 24% de cellulose.

Il n'a pas été possible de purifier les suspensions de MFC de la même façon que les pectines car cela menait systématiquement à la formation d'agrégats. Ces suspensions contiennent donc aussi des sels issus de leur fabrication.

I.2. Intégration de calcium dans la composition

Le calcium est intégré dans la composition des films afin de créer les interactions pectiques. L'objectif est encore une fois d'obtenir un matériau plus représentatif de la paroi végétale en terme de structure. Une fois le film séché, le renforcement des fibrilles de cellulose (Falcoz-Vigne, 2016), en partie irréversible, rend potentiellement inaccessible certaines pectines lors de la réhydratation. Ce phénomène défavorise la création d'un réseau calcium-pectines idéal. L'ajout du calcium dès la fabrication du film peut aussi permettre de limiter la désorption d'une partie des pectines lors de sa réhydratation.

I.1.a Stratégie expérimentale

La difficulté de l'ajout de calcium est d'éviter des gélifications locales trop rapides avant coulage de la suspension ce qui créerait des hétérogénéités après séchage. Pour cela l'ajout est réalisé à 80°C, température à laquelle les interactions sont plus faibles. À cette température, les réactions de dégradations de pectines telles que la β -élimination et l'hydrolyse n'ont pas ou peu lieu (Sila et al., 2009). Les masses molaires des pectines ne sont donc pas réduites comme montré dans les tableaux suivants.

Tableau 6.1 : effet du chauffage à 80°C sur les masses molaires moyennes en poids (M_w) et en nombre des pectines (M_n) P35 et P71.

P35	M_w	M_n	P71	M_w	M_n
Initial	115,6 ± 2,1	38,0 ± 1,1	Initial	142,0 ± 0,2	43,4 ± 0,5
80°C	114,2 ± 0,7	39,7 ± 0,4	80°C	158,1 ± 0,3	54,9 ± 0,5

Le ratio en calcium introduit est défini par le ratio de deux fois la concentration en calcium divisée par la concentration en acides galacturoniques non méthylés :

$$R = 2 * \frac{[Ca^{2+}]}{[-COO^-]} \quad [6.1]$$

I.1.b Maintien de l'intégrité du film

Les pertes de pectines entre les compositions sans et avec $R = 0,25$ en calcium a été comparées par RMN de l'état solide. L'analyse des films MFC/P52 après trempage de 24h dans 10 mL de solution à 0,1 mol/L en Ca^{2+} ne montre pas de différence significative dans la perte de pectines (Figure 6.2). En effet, on remarque une diminution équivalente du pic C_1 des pectines (101,5 ppm) après trempage dans les deux cas.

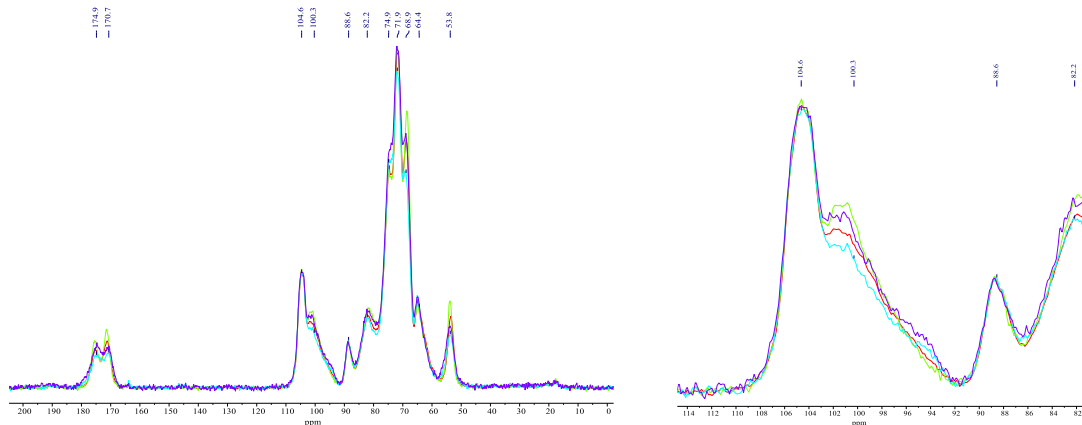


Figure 6.2 : spectres RMN 13C CP-MAS (A). Zoom sur la région des C1 (90 – 110 ppm) (B). Rouge : film MFC/P52 sans trempage ; vert : film MFC/P52/ Ca^{2+} sans trempage ; bleu : film MFC/P52 trempé 24h dans 0,1 mol/L Ca^{2+} ; violet : film MFC/P52/ Ca^{2+} trempé 24h dans 0,1 mol/L Ca^{2+}

En comparant les DM avant et après trempage, on s'aperçoit que celui-ci diminue d'environ 8% dans les deux compositions (Figure 6.3). Cette perte de pectines lors du trempage est donc liée à la solubilisation de pectines à haut degré de méthylation, qui ne contiennent pas assez de sites permettant des jonctions calciques.

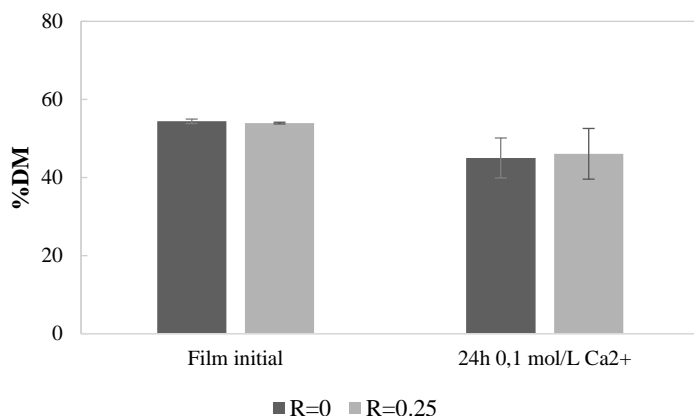


Figure 6.3 : DM avant et après réhydratation dans 0,1 mol/L de Ca²⁺ pendant 24h de matériaux réticulés (R=0,25) ou non (R=0) avant séchage.

Une comparaison visuelle de trempage des films MFC/P52 dans une solution à 0,001 mol/L de Ca²⁺ a cependant permis de montrer une meilleure résistance au gonflement des films composés avec du calcium (Figure 6.4). Même après plusieurs jours de trempage, les films contenant R = 0,25 de calcium gardent leur forme initiale et ne se cassent pas lors de l'agitation du tube contrairement aux films composés sans calcium qui cassent après quelques heures de trempage.

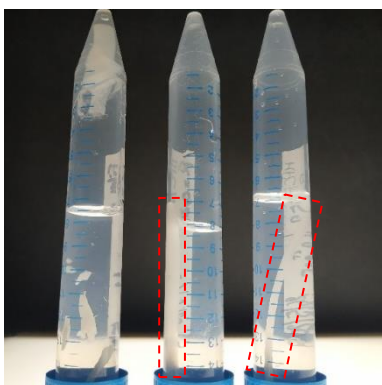


Figure 6.4 : Films réhydratés dans 10 mL à 0,001 mol/L Ca²⁺. Gauche : MFC/P35 ; centre : MFC/P35/ Ca²⁺ ; droite : MFC/P52/ Ca²⁺.

Le réseau pectines-calcium initié avant séchage semble renforcer la tenue du film lors de sa réhydratation dans une solution peu concentrée en calcium. Dans une solution concentrée en calcium, cela ne permet cependant pas de diminuer la perte en pectines fortement méthylées.

I.3. Influence du ratio de calcium dans la composition initiale sur les propriétés des matériaux MFC/P52

Les matériaux sont réalisés par gélification des pectines dans une suspension de MFC avant séchage. Le taux de réticulation de ces systèmes avant réhydratation est contrôlé par le ratio de calcium R intégré à la composition et décrit en équation [6.1]. L'impact du ratio R utilisé pour cette gélification sur les propriétés finales des matériaux réhydratés est étudié avec des matériaux MFC/P52 dont le R initial varie de 0 à 0,5. Ils sont réhydratés dans 0,1 mol/L de Ca²⁺.

I.1.c Impact sur le gonflement

Une comparaison du taux de gonflement a été réalisée par trempage des films dans 10 mL de solution à 0,1 mol/L en Ca²⁺ (Figure 6.5). La masse de film sec est déterminée après réhydratation et tient compte de la perte éventuelle de matière lors de la réhydratation.

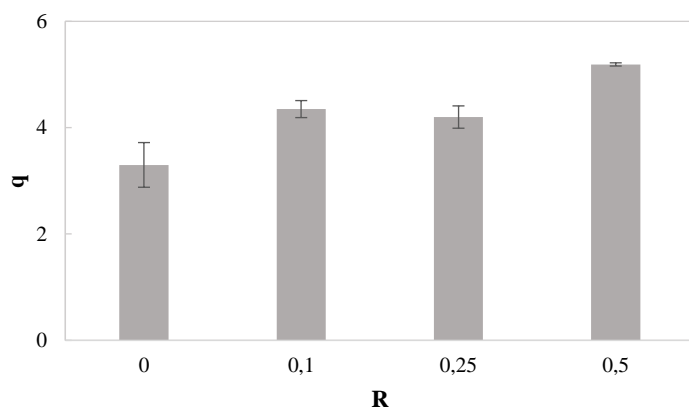


Figure 6.5 : comparaison du taux de gonflement selon le R initial du matériau MFC/P52. Réhydratation 4h dans 10 mL de Ca^{2+} à 0,1 mol/L.

Les matériaux à $R = 0$ en calcium initial gonflent moins que les autres compositions et le gonflement semble légèrement augmenter avec l'augmentation du R. Si la valeur de R avait un impact sur le degré de réticulation des matériaux après réhydratation dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} , on s'attendrait à une diminution du taux de gonflement avec l'augmentation du degré de réticulation initial. Comme ce n'est pas le cas, on peut supposer que la réhydratation dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} permet d'obtenir le même degré de réticulation final.

L'augmentation du taux de gonflement des matériaux contenant du calcium dans la composition initiale comparés au matériau sans calcium initialement laisse donc supposer une différence de structure entre ces matériaux. Il est possible que la formation du réseau pectines-calcium avant séchage limite l'agrégation irréversible de certaines MFC (Arola et al., 2013; Maia et al., 2019). Plus de surface est alors disponibles pour interagir avec des molécules d'eau au moment de la réhydratation.

I.1.d Impact sur les propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de matériaux composés avec différents ratios de calcium initial R ont été mesurées par essai de traction après réhydratation dans 10 mL à 0,1 mol/L de Ca^{2+} . On s'intéresse dans un premier temps à comparer les modules d'élasticité obtenus pour chaque composition (Figure 6.6).

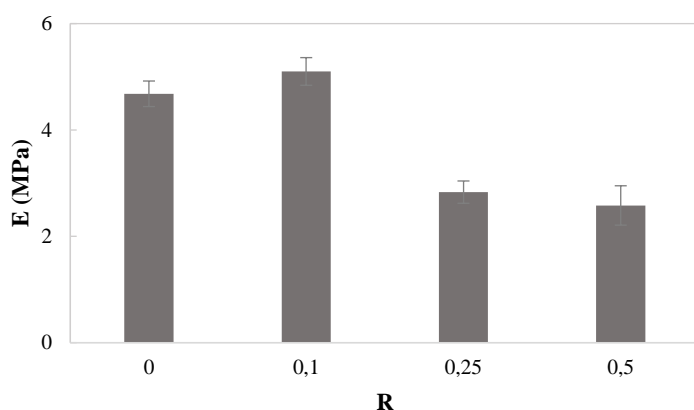


Figure 6.6 : comparaison du module d'Young selon le R initial du matériau MFC/P52. Réhydratation 4h dans 10 mL de Ca^{2+} à 0,1 mol/L.

Il y a une chute du module pour les compositions contenant $R = 0,25$ et $R = 0,5$ de calcium dans la composition initiale. Le taux de gonflement plus élevé pour ces compositions peut expliquer en partie cet effet. Ensuite, comme évoqué précédemment, le gel pectines-calcium créé peut permettre de limiter la formation d'interactions irréversibles entre MFC au moment du séchage. Une diminution de la rigidité du matériau peut résulter de cette réduction d'interactions entre MFC. Le ratio $R = 0,1$ n'est peut-être pas suffisant pour former un gel assez rigide pour prévenir ces interactions, ce qui expliquerait l'obtention d'un module proche de celui du matériau non réticulé initialement. À partir de $R = 0,25$, la valeur du ratio en calcium introduit dans la composition ne semble pas avoir de conséquences sur le comportement du matériau après réhydratation.

On s'intéresse ensuite à comparer les propriétés à la rupture des compositions $R = 0$ et $R = 0,25$. Une courbe de traction de chaque composition est représentée dans la figure suivante.

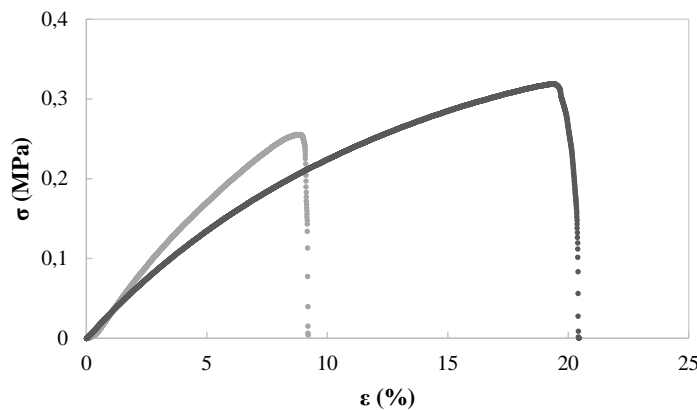


Figure 6.7 : courbes de tractions des matériaux MFC/P52 avec $R = 0$ (gris) ou $R = 0,25$ (noir). $[Ca^{2+}] = 0,1 \text{ mol/L}$.

On remarque une augmentation de l'élongation avant rupture des films composés avec $R = 0,25$ de calcium (courbe noire) comparé aux films composés sans calcium (courbe grise). La contrainte à la rupture est également légèrement supérieure pour le matériau contenant du calcium initialement. Les propriétés des deux matériaux sont comparées dans le Tableau 6.2.

Tableau 6.2: propriétés en traction des matériaux MFC/P52 avec $R = 0$ ou $R = 0,25$, réhydratés dans 10 mL à 0,1 mol/L en Ca^{2+} .

R	σ_{\max} (MPa)	ϵ_{\max} (%)	E (MPa)
0	$0,2 \pm 0,1$	$7,3 \pm 2,4$	$4,7 \pm 0,2$
0,25	$0,3 \pm 0,0$	$18,6 \pm 2,1$	$2,8 \pm 0,5$

La présence de calcium dans la composition initiale rend le matériau réhydraté moins rigide mais aussi moins fragile et plus déformable.

Le gel initial semble donc limiter le collapse irréversible des MFC lors du séchage (Figure 6.8) et conduit à des matériaux plus résistants et plus facile à manipuler. À partir de $R = 0,25$, ce ratio n'influe pas sur le degré de réticulation final du matériau réhydraté car des propriétés similaires sont obtenues avec un $R = 0,5$. Pour cette raison, les matériaux étudiés sont composés avec des ratios en calcium initiaux R de 0,25 ou de 0,5.

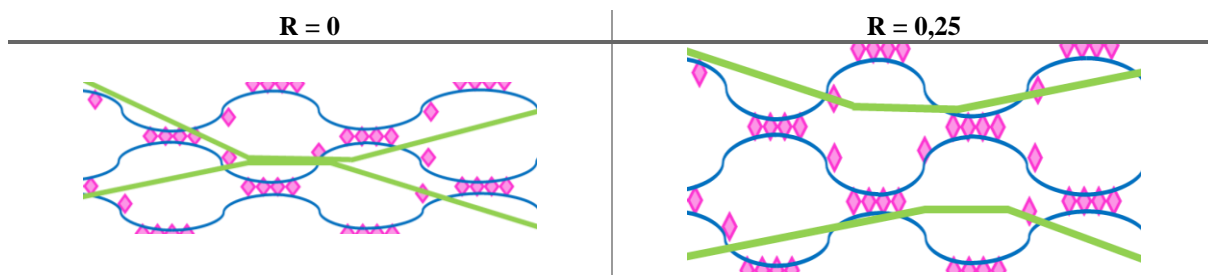


Figure 6.8 : schéma représentant la différence de gonflement après réhydratation entre un matériau non gélifié avant séchage ($R = 0$) et un matériau gélifié avant séchage ($R = 0,25$). Les MFC sont représentées par les traits verts.

II. Annexes du chapitre 3

II.1. Conséquences de la variation de la concentration en calcium dans le milieu de réhydratation

Il est possible d'obtenir des taux de gonflement élevés à très basse concentration en calcium. Par exemple, à 0,001 mol/L de calcium dans la solution de réhydratation, le taux de gonflement du matériau MFC/P52 est d'environ 50. Malgré cette absorption importante d'eau, les gels étudiés restent autosupportés.

I.1.e Pertes de matière

La concentration en calcium du milieu d'immersion a cependant des conséquences sur la perte de matière au cours de la réhydratation du matériau (Figure 6.9). Cette dernière augmente fortement avec la diminution de la concentration, jusqu'à atteindre environ 60% à 0,001 mol/L en Ca^{2+} .

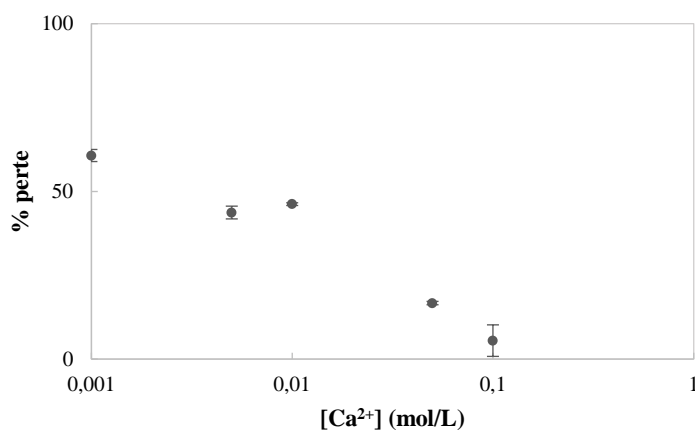


Figure 6.9 : évolution du pourcentage de perte massique avec la concentration en calcium de la phase aqueuse. Réhydratation 2h dans 10 mL. MFC/P52 ($R = 0,25$).

Dans une solution de 10 mL à 0,001 mol/L, le nombre de mole de calcium est supérieur au nombre de moles de calcium présent initialement dans le film pour une composition à $R = 0,25$ ($0,5 \cdot 10^{-5}$ mol). Mais cette quantité est juste suffisante, pour former le maximum de jonction possible (ce qui équivaut à $R = 0,5$). Il est donc possible que des pectines non réticulées se solubilisent lors de la réhydratation.

Cependant, pour des concentrations supérieures en Ca^{2+} dans la solution de réhydratation, on observe aussi une importante perte de matière. Il est très probable que le degré de méthylation ne soit pas uniforme à l'ensemble des macromolécules et que les plus méthylées se solubilisent. Il est aussi possible que certaines MFC s'extraitent du matériau au cours du gonflement. À forte concentration ionique, la diminution du taux de gonflement et donc du degré d'hydratation du matériau ainsi que le phénomène de condensation des contre-ions peuvent favoriser les interactions entre macromolécules et limiter leur solubilisation ou désorption.

Lors d'une réhydratation dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} , le pourcentage de perte massique est faible et proche de l'incertitude d'une mesure de masse d'un matériau hydraté. On peut alors analyser par RMN les matériaux avant et après réhydratation pour avoir une idée plus précise de l'origine des pertes (Figure 6.10).

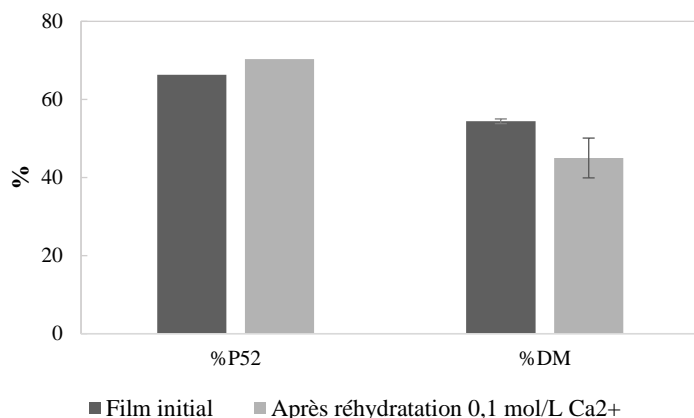


Figure 6.10 : analyse par RMN du pourcentage de pectines et de leur DM des matériaux MFC/P52 ($R = 0,25$) avant et après réhydratation pendant 24h dans 10 mL à 0,1 mol/L Ca^{2+} .

On remarque que dans ce cas, le film ne semble pas perdre de pectines. Pourtant, le DM est modifié suite à la réhydratation. Il se peut alors qu'environ autant de MFC et de pectines se soient désorbées du matériau. Les pectines les plus méthylées n'étant pas intégrées au gel se solubilisent plus facilement et conduisent à une diminution du degré de méthylation effectif dans le gel.

La composition du matériau est donc modifiée lors de la réhydratation par solubilisation des pectines fortement méthylées et extraction de MFC. Cela peut mener à de mauvaises interprétations concernant l'évolution du gonflement selon la nature du milieu de réhydratation. Pour des matériaux peu gonflés, les pertes sont équivalentes et sont donc négligées dans la plupart des analyses suivantes.

À partir de $[Ca^{2+}] = 0,05$ mol/L, les matériaux hydratés sont constitués d'environ 80% d'eau pour 20% de polysaccharides. Ce taux d'hydratation peut être comparable à celui d'une paroi cellulaire végétale (Albersheim et al., 2011). Mais le film perd environ 20% de matière lors d'une réhydratation dans 0,05 mol/L de Ca^{2+} contre seulement environ 5% dans 0,1 mol/L de Ca^{2+} . Cette concentration sera donc fixée lors de la plupart des essais. À cette concentration, les jonctions pectiques sont stabilisées grâce aux interactions électrostatiques avec les ions calcium et aux interactions favorisées par la force ionique.

I.1.f Compétition entre la force ionique et le taux de réticulation

À la fois la nature et la concentration des ions du milieu de réhydratation permettent de contrôler la structure et le gonflement d'un gel de pectines. Des essais supplémentaires montrent qu'il est possible de compenser une diminution du taux de réticulation pectines-calcium par le contrôle de la pression ionique π_{ion} du réseau de polyélectrolyte (Figure 6.11) par l'ajout de NaCl.

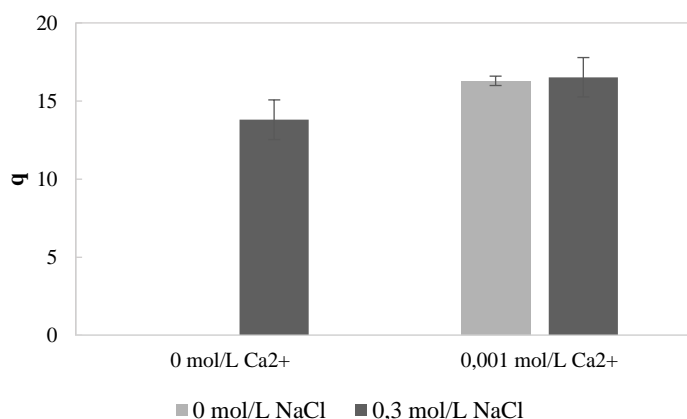


Figure 6.11 : comparaison des taux de gonflement selon la force ionique et la présence de calcium. Réhydratation 4h dans 10 mL. MFC/P52 ($R = 0,5$).

En absence de calcium dans la solution de réhydratation, le matériau n'est pas autosupporté et se disperse au cours de la réhydratation. Les jonctions pectines-calcium sont issues d'interactions faibles et réversibles. Si le milieu de réhydratation ne contient pas la quantité nécessaire d'ions pour maintenir les jonctions, la plupart des ions Ca^{2+} se dispersent dans la solution par équilibre osmotique.

On observe cependant que, même dans une solution de réhydratation ne contenant pas de Ca^{2+} et malgré l'échange des interactions des ions Ca^{2+} par des ions Na^+ , la force ionique générée par la présence de 0,3 mol/L de NaCl permet de conserver la cohésion du film. Les charges des macromolécules sont masquées par la forte concentration en contre-ions ce qui favorise les interactions entre les pectines.

En présence de calcium à 0,001 mol/L, le taux de gonflement est identique entre le film réhydraté dans la solution contenant 0,3 mol/L de NaCl et le film réhydraté dans une solution n'en contenant pas. La force ionique permet de contrebalancer la perte de jonctions et de maintenir un même niveau de gonflement dans 2 solutions de réhydratation très différentes.

Ces différentes stratégies de réhydratation de nos matériaux révèlent la nature réversible des jonctions physiques entre les ions calcium et les pectines. Un gel pectique, contrairement à un réseau covalent classique, est donc très sensible à la nature des ions dans son solvant de gonflement. De plus, la présence de charges permanentes en dehors des jonctions rend également ce gel sensible à la concentration ionique du solvant.

II.2. Relation entre la concentration en PEG et la pression osmotique de la solution

Parsegian *et al.* (1986) ont établi une relation entre la concentration massique d'une solution de PEG de masse molaire 20000 g/mol et la pression osmotique engendrée :

$$\pi = 1,61 + 2,72 * C_{PEG}^{0,21} \quad [6.2]$$

Avec C_{PEG} , le pourcentage massique de PEG 20000 dans la solution.

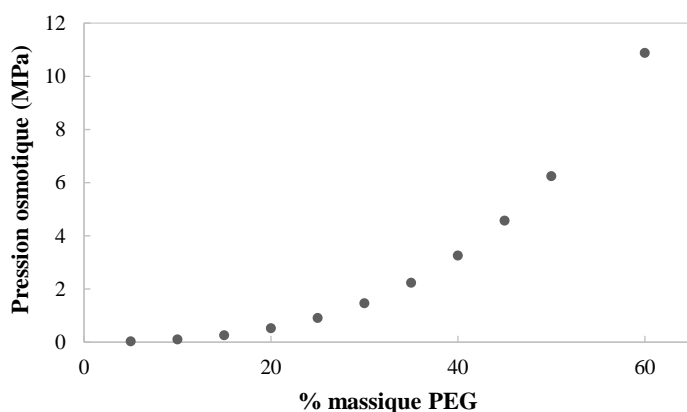


Figure 6.12 : évolution de la pression osmotique dans une solution aqueuse en fonction du pourcentage de PEG de masse molaire 20000 g/mol.

Cette relation est utilisée pour calculer la pression osmotique de nos milieux de réhydratation.

II.3. Caractérisation du xyloglucane et évaluation de son interaction avec les MFC

Une méthode de quantification du xyloglucane, développée par Kooiman (1960), est utilisée pour quantifier le pourcentage de xyloglucane s'adsorbant sur les MFC. Ce dosage utilise la propriété de complexation de l'iode avec le xyloglucane.

I.1.g Protocole

Une gamme d'étalonnage est réalisée avec des concentrations de xyloglucane entre 0,05 et 0,35 mg/mL. 1 mL de solution de xyloglucane est ajouté à un mélange de 5 mL de sulfate de sodium à 0,2 g/mL et de 0,5 mL de solution de KI/I_2 de concentrations massiques 1%/0,05%. La réaction est réalisée à température ambiante pendant 40 min dans l'obscurité. L'absorbance des étalons dilués est mesurée à 650 nm à l'aide d'un spectromètre UV Cary 50 (Varian). Un coefficient de molarité $\epsilon = 19,11 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ est obtenu avec cette gamme d'étalonnage.

Afin de quantifier le xyloglucane libre dans le surnageant d'une suspension MFC-XG. Le surnageant de la suspension de MFC (XG 0%) est utilisé comme échantillon témoin pour éliminer la possibilité d'absorbance par les MFC.

Des suspensions xyloglucane-MFC sont réalisées en mélangeant pendant une nuit une suspension de MFC à 3,3% de masse sèche et une solution de xyloglucane à 0,01 g/mL. Le xyloglucane est introduit dans une suspension de MFC à un ratio relatif à la masse de MFC et des suspensions avec les ratios suivants en xyloglucane : 0%, 5%, 10%, 15% et 20% sont étudiées. La suspension XG-MFC est contrôlée à une concentration de 2,5% massique en polysaccharides grâce à l'ajout d'eau distillée.

La suspension de polysaccharides est ensuite centrifugée à 3000 g pendant 30 min à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 1-6P E3470. Environ 4 mL de surnageant sont obtenus pour chaque ratio.

1 mL de surnageant est alors ajouté à une solution de 5 mL de sulfate de sodium (à 0,2 g/mL) et 0,5 mL de solution KI/I₂ (1%/0,05%). La réaction est réalisée pendant 40 min à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 650 nm. L'expérience est répétée trois fois.

I.1.h Résultats

Dans le chapitre 1, les études concernant les interactions entre le xyloglucane et la cellulose ont été présentées. Le xyloglucane interagit très facilement avec la cellulose en raison de leurs similitudes moléculaires. Il est admis qu'environ 10% de xyloglucane s'adsorbe à la surface de nanocristaux de cellulose (CNC) (Navon, 2020). Un paramètre supplémentaire à prendre en compte dans nos compositions est donc l'adsorption d'une partie du xyloglucane sur les microfibrilles de cellulose.

Ici, de la cellulose microfibrillée (MFC) est utilisée à la place de nanocristaux de cellulose (CNC). Même si ces deux matières sont des nanocelluloses avec des dimensions latérales comparables et donc une surface spécifique comparable, les phénomènes d'interactions peuvent être perturbés par la longueur des fibrilles. Lors de la fabrication de nos films biomimétiques, la solution de polysaccharides est fixée à 2,5 % en masse. Par conséquent, il est nécessaire de vérifier la quantité de xyloglucane s'adsorbant sur des MFC, dans ces conditions.

Une méthode de quantification du xyloglucane développée par Kooiman est utilisée pour vérifier l'adsorption du xyloglucane sur les MFC. Ce dosage utilise la propriété de complexation de l'iode avec le xyloglucane. Il a été confirmé que l'iode ne forme pas de complexe avec la cellulose. Afin de quantifier le xyloglucane libre dans le surnageant d'une suspension MFC-XG, le xyloglucane est mélangé à une suspension de MFC. La quantité de XG introduite est donnée par son pourcentage relatif à la quantité cellulose. L'ensemble de la suspension est à une concentration de 2,5% massique en polysaccharides. Des suspensions avec les pourcentages suivants en xyloglucane : 0%, 5%, 10%, 15% et 20% sont analysées. Le changement de couleur des surnageants est représenté sur la Figure 6.13.

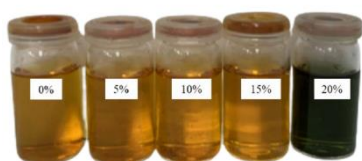


Figure 6.13 : : analyse colorimétrique des surnageants. Les pourcentages indiquent la quantité de xyloglucane par rapport à la quantité de MFC.

Aux ratios 5% et 10% de XG par rapport à la MFC, aucune molécule de xyloglucane n'est quantifiée dans le surnageant. Cela suggère l'absorption de l'ensemble du xyloglucane sur les MFC à ces concentrations et dans ces conditions. À un ratio de 15% de XG dans la suspension, la concentration de XG restant dans le surnageant est très faible et hors de la gamme de quantification. Au ratio 20%, une grande quantité de xyloglucane est détectée dans le surnageant.

Tableau 6.3 : dosage colorimétrique du surnageant après centrifugation de suspensions MFC/XG à concentration croissante en XG.

Ratio XG/MFC (%)	Absorbance surnageant	[XG] surnageant (mg/mL)
5	-0,004	-
10	-0,007	-
15	0,007	-
20	0,602	0,205

Les résultats sont cohérents avec ce qui avait été montré pour l'adsorption du XG sur les CNC.

II.4. Modèle d'Halpin-Kardos

Le modèle d'Halpin-Kardos considère le composite comme un matériau stratifié composé de plis pour lesquels les charges sont orientées de façon unidirectionnelle. Le calcul a été réalisé sur un assemblage de 4 plis orientés à 0°, -45°, 45° et 90° (Favier, 1995).

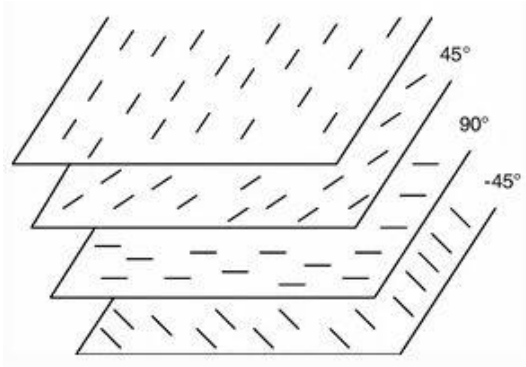


Figure 6.14 : représentation schématique d'un composite quasi-isotrope selon Halpin-Kardos.

Les modules de chaque pli E_{ii} ($i = 1, 2$) et G_{12} sont calculés grâce aux équations suivantes :

$$\frac{E_{ii}}{G_m} = \frac{2E_{iif}(1 + \nu_m)(1 + \zeta_{ii}X_f) + 4\zeta_{ii}(1 + \nu_m)^2(1 - X_f)G_m}{E_{iif}(1 - X_f) + (\zeta_{12} + X_f)G_m} \quad [6.3]$$

Et

$$\frac{G_{12}}{G_m} = \frac{G_f(1 + \zeta_{12}X_f) + \zeta_{12}(1 - X_f)G_m}{G_f(1 - X_f) + (\zeta_{12} + X_f)G_m} \quad [6.4]$$

Avec :

- $i = 1$: la direction longitudinale des fibres ; et $i = 2$: la direction transversale
- E_{iif} : module d'Young de la fibre dans la direction i ($i = 1, 2$)
- G_f et G_m : les modules de cisaillement de la fibre et de la matrice respectivement
- ν_m : le coefficient de Poisson de la matrice
- X_f : la fraction volumique de fibres
- ζ_{ii} : des paramètres géométriques issus du facteur de forme de la fibre

$$\zeta_{11} = 2 \frac{L}{e} \quad [6.5]$$

$$\zeta_{22} = 2 \frac{l}{e} \quad [6.6]$$

$$\zeta_{12} = \left(\frac{1}{e}\right)^{\sqrt{3}} \quad [6.7]$$

L , l et e sont respectivement la longueur, la largeur et l'épaisseur de la fibre.

Le module de cisaillement du composite est alors calculé grâce à l'équation :

$$G = \frac{E_{11} + E_{22}(1 - \nu_{12})}{8(1 - \nu_{12}\nu_{21})} + \frac{G_{12}}{2} \quad [6.8]$$

Avec les coefficients de Poisson :

$$\nu_{12} = X_f \nu_f + (1 - X_f) \nu_m \quad [6.9]$$

$$\nu_{21} = \nu_{12} \frac{E_{22}}{E_{11}} \quad [6.10]$$

Où ν_f est le coefficient de Poisson de la fibre.

III. Annexes du chapitre 4

III.1. Influence du DM initial des pectines sur la réactivité de AaPME

En solution, la réactivité de l'enzyme est dépendante du DM des pectines. La même comparaison est réalisée pour des films contenant soit des pectines de DM 31% initial (P35) ou de DM 52% initial (P52). Les réactions sont effectuées dans 10 mL avec une concentration en AaPME de 5 $\mu\text{g/mL}$. Les DM sont quantifiés par RMN.

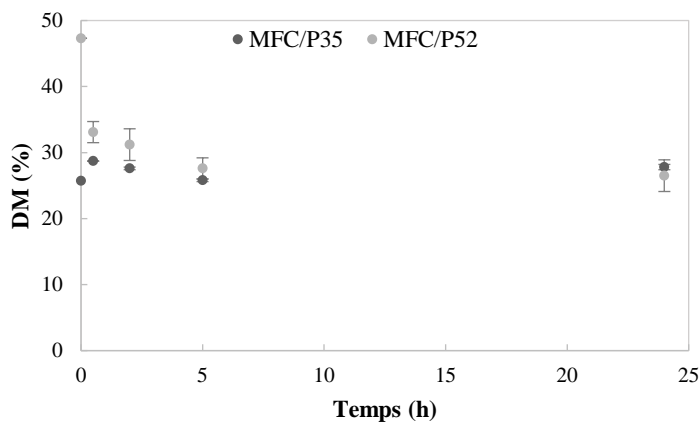


Figure 6.15 : évolution du DM déterminé par analyse RMN des matériaux. Réaction sur matériaux MFC/P35 (30/70), $R = 0,25$.

Contrairement aux matériaux contenant initialement des pectines de DM 52%, les matériaux constitués de pectines P35 ne sont pas modifiés par AaPME.

L'absence de réaction sur les matériaux MFC/P35 est vérifiée par mesure de leur module après réaction. La Figure 6.16 donne le module en fonction de la durée de réaction avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de AaPME. Les taux de gonflement après réaction sont identiques au taux de gonflement initial ($2,5 \pm 0,3$).

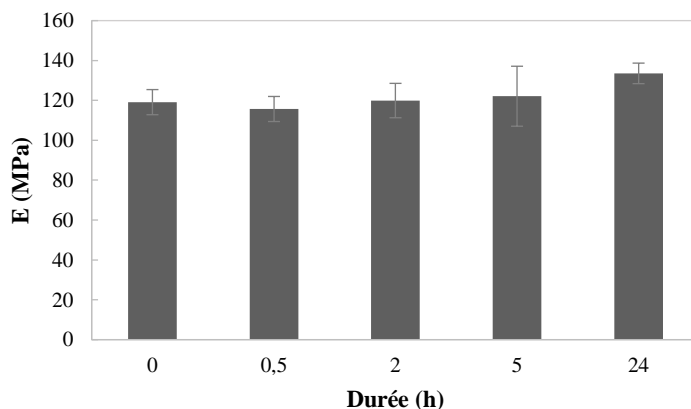


Figure 6.16 : modules d'Young des matériaux après modifications par AaPME de différentes durées. Réaction sur matériaux MFC/P35 (30/70), $R = 0,25$.

Tout comme le DM, les propriétés des matériaux ne sont pas modifiées ce qui confirme l'absence de réaction lorsque le DM des pectines est d'environ 30%.

III.2. Analyses du DB par profilage oligomérique des pectines après action d'AaPME sur les matériaux MFC/P52

Le laboratoire BIOPI a réalisé le profilage oligomérique des pectines des matériaux ayant réagi avec AaPME. Le profilage oligomérique consiste à dépolymériser partiellement les pectines par une endo-PG et à analyser par LCMS les oligomères en résultant. Moins ces oligomères sont méthylés et plus l'enzyme agit de façon processive.

La figure suivante illustre le profil des pectines mis en présence de 0,5 µg/mL de AaPME pendant 2h, menant à un DM de 38,4%. Ce profil est comparé à celui de pectines de matériaux mis en présence de AaPME dénaturée par ébullition pendant 24h.

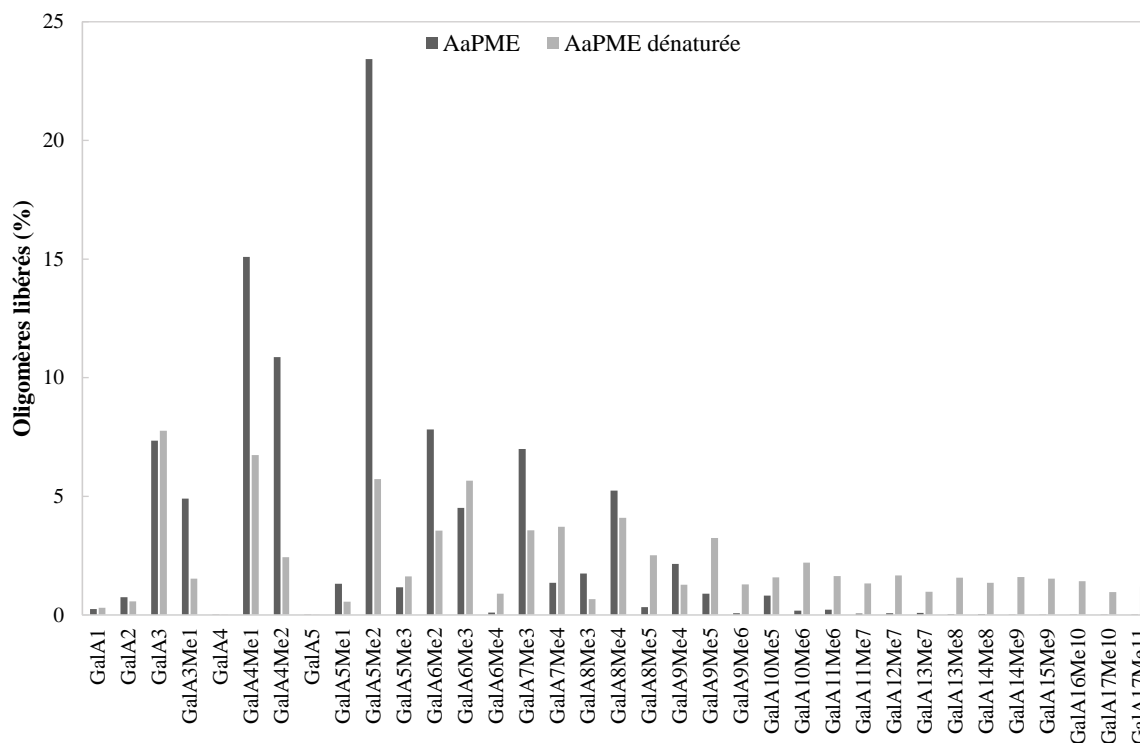


Figure 6.17 : profil des oligomères libérés par les pectines après réaction des matériaux MFC/P52 avec AaPME ou avec AaPME dénaturée.

On observe que l'action de l'enzyme mène à la libération de plus d'oligomères faiblement méthylés. Le pourcentage de longs blocs non méthylés (GalA1, GalA2, GalA3, GalA45 et GalA5) n'a pas augmenté avec la réaction, on peut donc supposer qu'AaPME ne déméthyle pas de façon processive les pectines des matériaux¹¹.

La différence de profil suite à des conditions de réactions différentes est également comparée. L'effet de la présence de PEG dans le milieu de réaction, conduisant à une diminution du gonflement du matériau est étudié. Les deux réactions ont été réalisées avec 0,5 µg/mL d'AaPME pendant 2h. la réaction en présence de 10% de PEG mène à un DM de 45,8%.

¹¹ Avec cette méthode de détection, le facteur de réponse varie pour chaque oligomères. Cette méthode donne donc un résultat qualitatif mais non quantitatif.

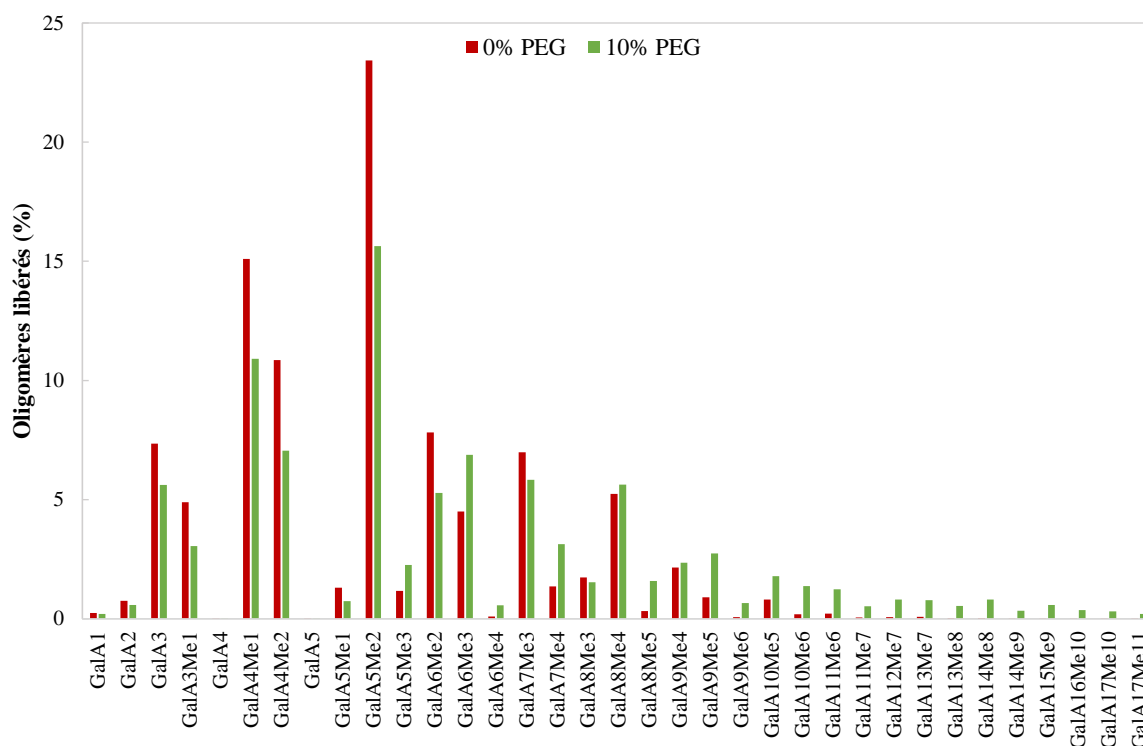


Figure 6.18 : profil des oligomères libérés par les pectines après réaction des matériaux MFC/P52 avec AaPME en absence ou en présence de 10% de PEG dans le milieu réactif.

Les mêmes types d'oligomères sont libérés par les deux réactions. La présence de PEG et d'un volume de matériau réduit ne semble donc pas modifier la processivité de cette enzyme.

D'autres paramètres de réaction ont été évalués : la durée de réaction et le pH. De la même façon, il semble qu'aucun ne mène à une différence de profil significative.

III.3. Phénotypes végétaux de dégradation par des PG

L'application des PG sur les cultures d'*Arabidopsis thaliana* mène à des réductions des longueurs des hypocotyles et à des détachement cellulaires, illustrés par les photos suivantes.

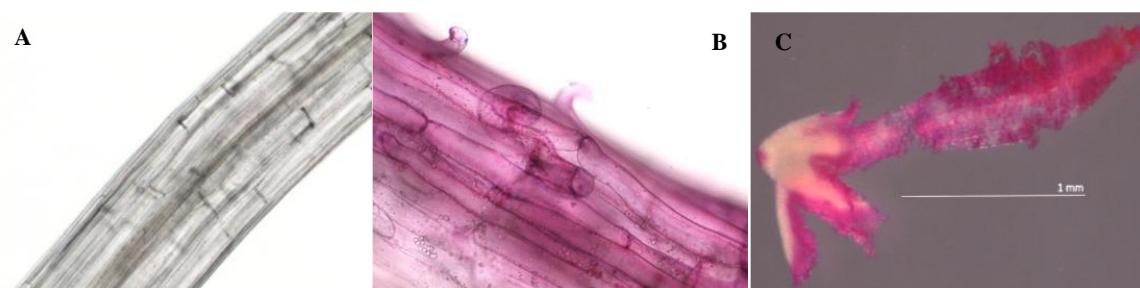


Figure 6.19 : photo à la loupe binoculaire, après coloration des parois cellulaires, de zones de décollement cellulaires sur les hypocotyles d'*A. thaliana* sans ou après application de vPG1 (A), PGLR (B) et ADPG2 (C) dans le milieu de culture. (c) Wafae Tabi

IV. Annexes du chapitre 5

IV.1. Analyse statistique des résultats

Afin de vérifier si les différences de résultats entre deux matériaux sont significatives, une analyse statistique a été réalisée en utilisant la méthode du test de Student. On calcule la valeur p, permettant de quantifier la significativité des résultats, en fixant le risque d'erreur à 5%. La différence de résultats est significative lorsque la valeur p obtenue est inférieure à 0,05.

Les valeurs p, comparant chaque matériau entre eux, sont rassemblées dans les tableaux suivant pour chaque grandeur calculée avec les différents essais.

I.1.i Fluage

Tableau 6.4 : valeurs p des paramètres a caractérisant la vitesse de fluage.

Matériaux comparés		a
MFC/P35	MFC/P35/Ca ²⁺	0,34
MFC/P35	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,00
MFC/P35/Ca ²⁺	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,00

I.1.j Essais cycliques : analyse des déformations

Tableau 6.5 : valeurs p des déformations calculées à partir de la décomposition des essais cycliques.

Matériaux comparés		ϵ_p	$\epsilon_{ve}(10)$	$\epsilon_{ve}(10)/\epsilon_p$	$\epsilon_{ve}(\infty)$
MFC/P35	MFC/P35/Ca ²⁺	0,29	0,02	0,11	0,02
MFC/P35	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,01	0,00	0,00	0,30
MFC/P35/Ca ²⁺	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,08	0,04	0,04	0,05

I.1.k Essais cycliques : analyse des énergies

Tableau 6.6 : valeurs p des énergies calculées à partir de la décomposition des essais cycliques.

Matériaux comparés		$\Delta E(2)/E_r(2)$	$\Delta E_{\text{plastique}}/E_r(1)$	$\Delta E_{\text{relaxation}}$
MFC/P35	MFC/P35/Ca ²⁺	0,76	0,74	0,00
MFC/P35	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,00	0,11	0,00
MFC/P35/Ca ²⁺	MFC/P35/XG/Ca ²⁺	0,00	0,17	0,01

Ces analyses statistiques permettent de confirmer les comparaisons réalisées dans le chapitre 5.

IV.2. Champs de déformation

Afin d'observer directement la déformation sur le matériau, des essais de traction uniaxiale sont effectués sur des échantillons peints d'un mouchetis. À l'aide d'une caméra et d'un logiciel adapté, le champ de déformation est déterminé en prenant des photos à un intervalle de temps donné. Cela permet de vérifier si la déformation est homogène dans le matériau et si elle correspond bien à la valeur fournie par le déplacement des mors de la machine de traction.

La Figure 6.20 montre que le champ de déformation est globalement homogène sur l'ensemble de l'échantillon. En fin d'essai cependant, des concentrations de contraintes apparaissent aux abords des mors, ce qui explique que la rupture ait souvent lieu à ce niveau.

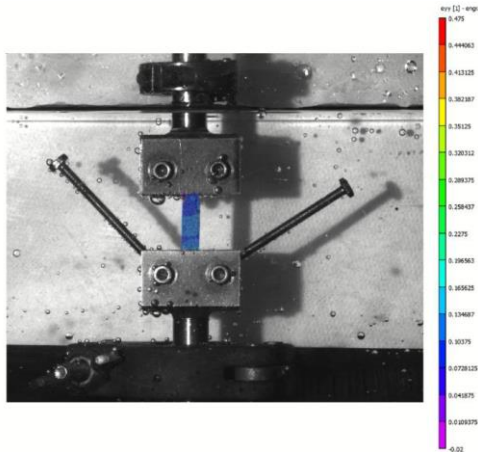


Figure 6.20 : observation du champ de déformation au cours de l'essai.

On observe, avec la Figure 6.21, que la déformation réelle (mesurée par la caméra) est légèrement inférieure à celle fournie par la machine de traction. La vitesse de déformation moyenne $\dot{\epsilon}$ vaut $0,140\% \cdot s^{-1}$ pour la caméra, contre $0,158\% \cdot s^{-1}$ pour la machine. Cela peut être causé par un léger glissement du matériau entre les mors.

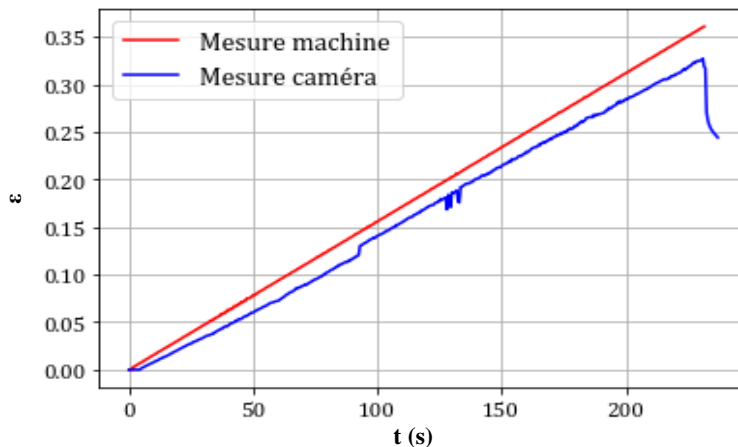


Figure 6.21 : évolution de la déformation longitudinale au cours du temps, mesurée soit par la machine de traction à l'aide de la course transverse du bras de traction ou à partir des images prises par la caméra de l'échantillon.

Pour l'ensemble des essais, seule la déformation donnée par la machine est utilisée. En effet, la différence observée avec la déformation réelle est faible, et la déformation machine est considérablement plus facile à obtenir d'un point de vue expérimental.

IV.3. Caractérisation de la viscoélasticité par DMA

L'analyse mécanique dynamique est une méthode de caractérisation classique de la viscoélasticité et a donc été utilisée pour caractériser ce comportement chez nos matériaux biomimétiques.

I.1.1 Principe

Une contrainte sinusoïdale est appliquée sur le matériau, et la réponse en déformation est mesurée. Ici, l'échantillon est sollicité en traction.

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t) \quad [6.11]$$

Avec σ_0 l'amplitude de contrainte (MPa), $\omega = 2\pi f$ et f la fréquence de sollicitation (Hz). L'échantillon se déforme avec un décalage de phase, ou angle de perte, δ (rad) :

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \sin(\omega t + \delta) \quad [6.12]$$

Dans le cas d'un matériau purement élastique $\delta = 0$ et dans le cas dans matériau purement visqueux $\delta = \pi/2$. Pour un matériau viscoélastique, l'angle de perte a donc une valeur comprise entre 0 et $\pi/2$.

Lors de ces essais, la fréquence de sollicitation est fixée à 10 Hz, pendant 15 min. Pour les matériaux MFC/P35 et MFC/P35/Ca²⁺, une contrainte statique de 0,5 MPa et une contrainte dynamique de 0,125 MPa sont appliquées. Pour le matériau contenant du xyloglucane (MFC/P35/XG/Ca²⁺), celui-ci étant moins rigide et plus fragile, une contrainte statique de 0,1 MPa et une contrainte dynamique de 0,025 MPa sont appliquées. Ces contraintes permettent d'atteindre des taux de déformation équivalents pour les différents matériaux.

La caractérisation par DMA permet d'obtenir à la fois le module élastique E et un module complexe E*. Ce dernier constitue une combinaison des comportements élastique et visqueux du matériau :

$$E^* = E' + iE'' \quad [6.13]$$

Avec E', le module de conservation caractérisant la contribution élastique :

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta \quad [6.14]$$

Et E'', le module de perte caractérisant les pertes d'énergie dues à la viscosité :

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta \quad [6.15]$$

Le facteur de perte, $\tan \delta$, représentant le rapport de l'énergie dissipée sur l'énergie conservée, est alors défini par :

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad [6.16]$$

Ce paramètre est comparé entre les différents matériaux et permet d'identifier l'influence de sa composition sur la viscosité.

I.1.m Résultats

On remarque dans un premier temps que le module E et le facteur de perte évoluent au cours de l'essai.

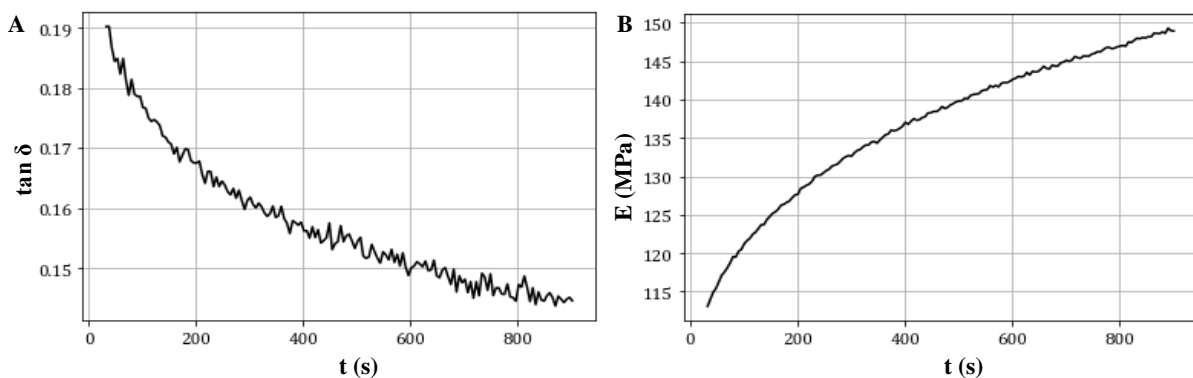


Figure 6.22 : évolution du facteur de perte $\tan \delta$ (A) et du module E (B) au cours d'un essai avec le matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Il semblerait que la viscosité du matériau diminue et que sa rigidité augmente quand on multiplie les sollicitations. Une réorganisation du matériau lors des sollicitations peut en être à l'origine. Mais cela rend l'analyse des résultats compliquée.

Si l'on calcule une moyenne de $\tan \delta$ sur l'ensemble de la durée de l'essai, on observe que le matériau contenant du xyloglucane a une valeur significativement plus élevée (Figure 6.23). En revanche, il n'y a pas de différence entre le matériau contenant du calcium initialement (MFC/P35/Ca²⁺) ou le matériau n'en contenant pas avant réhydratation (MFC/P35).

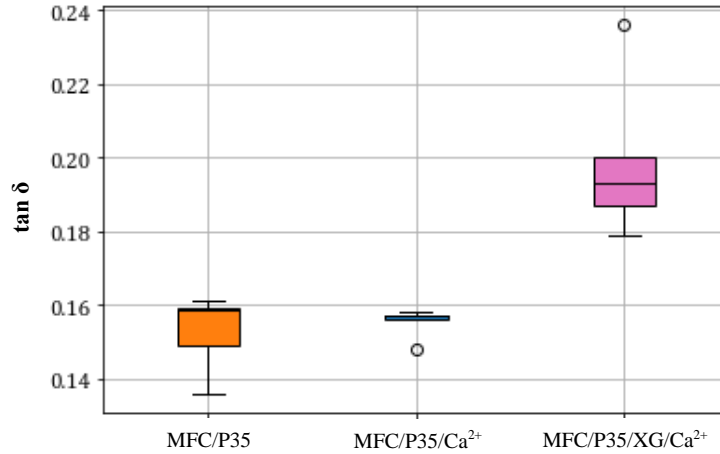


Figure 6.23 :comparaison du facteur de perte $\tan \delta$ des trois matériaux.

Le matériau contenant du xyloglucane semble donc plus visqueux que les deux autres.

Les analyses par DMA étant difficiles à relier à des analyses du comportement à l'échelle macroscopique, les essais n'ont pas été poursuivis. Il serait cependant intéressant de caractériser le matériau par un balayage en fréquences afin d'identifier des temps de relaxation caractéristiques des matériaux.

IV.4. Autre méthode de comparaison des essais de tractions cycliques

Une autre méthode de comparaison des déformations ε_{seuil} issus des essais de traction cyclique a également été utilisée.

La déformation seuil, ε_{seuil} , augmente de moins en moins avec le nombre de cycle. L'allure de la courbe semble suivre une fonction de type double-inverse entre le 2^{ème} et le 10^{ème} cycle.

$$\varepsilon_{seuil}(n) = \frac{A * n}{B + n} \quad [6.17]$$

Les paramètres A et B sont ajustés afin de faire correspondre cette fonction aux données expérimentales. Ce modèle suppose que la déformation seuil converge et ne croit pas indéfiniment. On a donc :

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \varepsilon_{seuil}(n) = A \quad [6.18]$$

À partir de l'équation [5.7] du chapitre 5, on peut écrire :

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \varepsilon_{seuil}(n) = \varepsilon_{el} + \varepsilon_p + \lim_{n \rightarrow \infty} \varepsilon_{ve}(n) \quad [6.19]$$

Soit :

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \varepsilon_{ve}(n) = \varepsilon_{ve}(\infty) = A - \varepsilon_{el} - \varepsilon_p \quad [6.20]$$

$\varepsilon_{ve}(\infty)$ représente la déformation viscoélastique estimée pour un nombre infini de cycles.

La déformation viscoélastique pour un nombre infini de cycle, $\varepsilon_{ve}(\infty)$, déterminée grâce à la modélisation par la fonction double inverse de la courbe de la déformation seuil en fonction du nombre de cycle, mène à une conclusion différente de celle donnée dans le chapitre 5 (Figure 6.24).

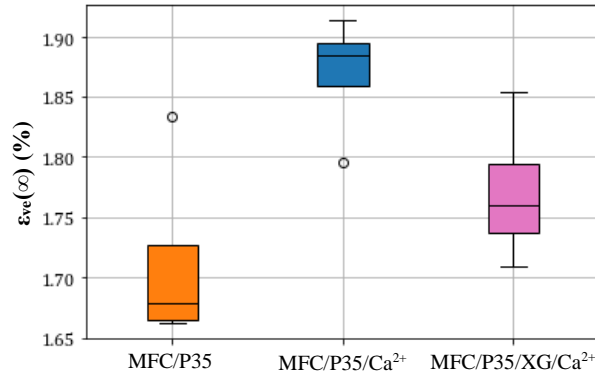


Figure 6.24 : comparaison de la déformation viscoélastique extrapolée pour un nombre infini de cycle $\varepsilon_{ve}(\infty)$.

On observe ici que le matériau MFC/P35/Ca²⁺ devient celui avec la plus grande valeur de déformation viscoélastique, lorsqu'on extrapole à la limite. Mais l'utilisation de cette fonction implique qu'une légère variation de l'allure de la courbe aux temps courts peut engendrer des résultats significativement différents lorsqu'on l'extrapole à l'infini. Il pourrait être intéressant de vérifier ce résultat en réalisant des essais cycliques avec un plus grand nombre de cycles.

IV.5. Modèle de Bingham : détail des équations

Pour rappel, dans ce modèle, un ressort élastique, un piston visqueux et un patin plastique sont mis en parallèle, ce qui permet de représenter les trois comportements élémentaires. L'ajout d'un ressort en série permet de modéliser l'élasticité pure. Les équations principales sont détaillées dans la Figure 6.25.

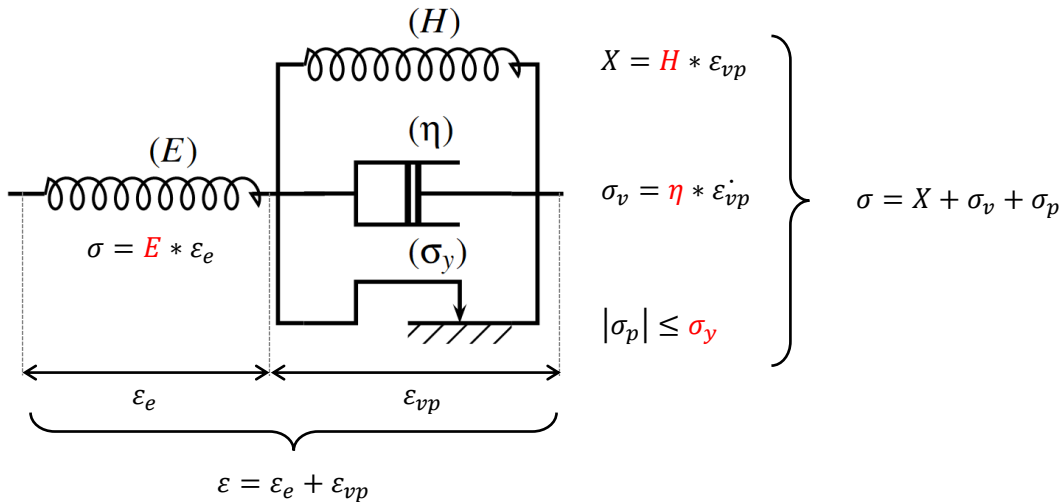


Figure 6.25 : schéma du modèle de Bingham généralisé.

On introduit $\dot{\varepsilon}_{vp}$, la dérivée de ε_{vp} en fonction du temps. Elle correspond à la vitesse de déformation viscoplastique. On distingue alors trois régimes de fonctionnement, selon que cette vitesse est nulle, positive ou négative :

- $\dot{\varepsilon}_{vp} = 0 \Leftrightarrow |\sigma_p| = |\sigma - H * \varepsilon_{vp}| \leq \sigma_y$
- $\dot{\varepsilon}_{vp} > 0 \Leftrightarrow \sigma_p = \sigma - H * \varepsilon_{vp} - \eta * \dot{\varepsilon}_{vp} = \sigma_y$
- $\dot{\varepsilon}_{vp} < 0 \Leftrightarrow \sigma_p = \sigma - H * \varepsilon_{vp} - \eta * \dot{\varepsilon}_{vp} = -\sigma_y$

Le cas (a) correspond à l'intérieur du domaine élastique ($|\sigma_p| < \sigma_y$). Les cas (b) et (c) caractérisent un écoulement plastique ($|\sigma_p| = \sigma_y$ et $|\dot{\sigma}_p| = 0$).

Les trois cas peuvent être regroupés dans l'équation suivante :

$$\eta * \dot{\varepsilon}_{vp} = \langle |\sigma - X| - \sigma_Y \rangle * \text{signe}(\sigma - X) \quad [6.21]$$

Avec : $\langle x \rangle = \max(x, 0)$

Finalement, on obtient l'équation caractéristique du modèle de Bingham généralisé :

$$\dot{\varepsilon}_{vp} = \frac{\langle |\sigma - X| - \sigma_Y \rangle}{\eta} * \text{signe}(\sigma - X) \quad [6.22]$$

I.1.n Modélisation des essais de relaxation

Pour les essais de relaxation de contraintes, la déformation est constante : $\varepsilon = \varepsilon_0 \Rightarrow \dot{\varepsilon} = 0$.

On peut donc simplifier l'équation [6.22] et obtenir finalement :

$$\sigma = \sigma_Y \frac{E}{E + H} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right) \right) + \frac{E * \varepsilon_0}{E + H} (H + E * \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right)) \quad [6.23]$$

On note τ_r le temps de relaxation du modèle :

$$\tau_r = \frac{\eta}{E + H}$$

I.1.o Modélisation des essais de fluage

Lors d'un essai de fluage, la contrainte est constante : $\sigma = \sigma_0 \Rightarrow \dot{\sigma} = 0$.

On obtient ainsi :

$$\varepsilon_{vp} = \frac{\sigma_0 - \sigma_Y}{H} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \right) \quad [6.24]$$

Avec τ_f , le temps de relaxation caractéristique de l'essai de fluage :

$$\tau_f = \frac{\eta}{H}$$

On peut ensuite obtenir la déformation totale ε :

$$\varepsilon = \varepsilon_e + \varepsilon_{vp} = \frac{\sigma_0}{E} + \frac{\sigma_0 - \sigma_Y}{H} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \right) \quad [6.25]$$

I.1.p Modélisation des essais de traction à vitesse constante

Lors d'un essai de traction à rupture, ni la déformation ni la contrainte ne sont constantes. On ne peut donc pas faire de simplification immédiate.

En revanche, lors des essais, les matériaux sont déformés à une vitesse $\dot{\varepsilon}$ constante. La déformation du matériau en chaque instant correspond à la consigne donnée à la machine.

La méthode d'Euler explicite est appliquée à ε_{vp} , afin d'approximer la dérivée :

$$\dot{\varepsilon}_{vp}(t_k) \approx \frac{\varepsilon_{vp}(t_{k+1}) - \varepsilon_{vp}(t_k)}{t_{k+1} - t_k}$$

Cette approximation permet ensuite d'isoler $\varepsilon_{vp}(t_{k+1})$ et d'écrire, à partir de l'équation [6.22] :

$$\varepsilon_{vp}(t_{k+1}) = \frac{\langle |\sigma(t_k) - X(t_k)| - \sigma_Y \rangle}{\eta} * \text{signe}(\sigma(t_k) - X(t_k)) * (t_{k+1} - t_k) + \varepsilon_{vp}(t_k) \quad [6.26]$$

On obtient ainsi une relation de récurrence, qui permet de calculer $\varepsilon_{vp}(t_{k+1})$ à partir de $\varepsilon_{vp}(t_k)$. Comme condition initiale, on pose $\varepsilon_{vp}(t_0) = 0$, avec $t_0 = 0$ s, correspondant à l'instant initial.

Par simplification, on a :

$$\sigma(t_k) - X(t_k) = E * \varepsilon(t_k) - \varepsilon_{vp}(t_k) * (E + H) \quad [6.27]$$

On peut ainsi obtenir la déformation viscoplastique au temps t_{k+1} en fonction de la déformation totale et de la déformation viscoplastique au temps t_k .

Finalement, on peut calculer la contrainte :

$$\sigma = E * \varepsilon_e = E(\varepsilon + \varepsilon_{vp}) \quad [6.28]$$

Ces équations fonctionnent également pour les essais de traction cycliques à vitesse constante.

IV.6. Modèle de Taiz

Un autre modèle semi-empirique, issu d'étude sur le comportement de paroi végétales, a aussi été utilisé pour décrire le comportement de nos matériaux. L'équation empirique décrite par Taiz (1984) se base sur un spectre continu de temps de relaxation :

$$\sigma(t) = b \log\left(\frac{t + T_m}{t + T_0}\right) + c \quad [6.29]$$

T_0 et T_m représentent les temps de relaxation minimum et maximum, respectivement. Les constantes b et c dépendent de certaines propriétés du matériau, comme les concentrations des différents composants ou la densité de réticulation.

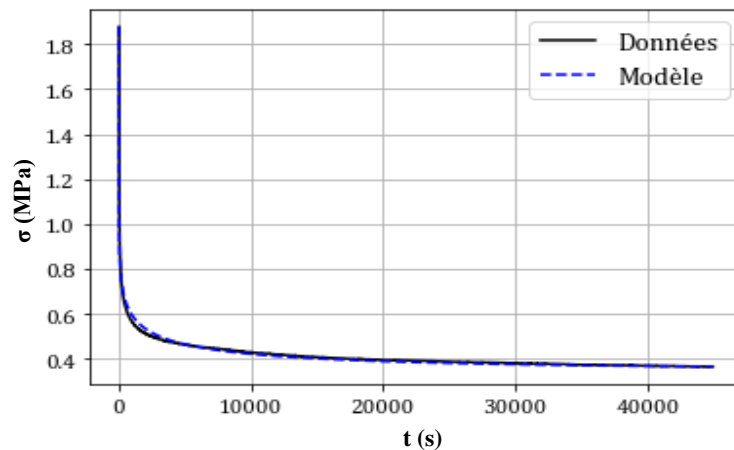


Figure 6.26 : comparaison du modèle de Taiz avec les données de relaxation des contraintes du matériau MFC/P35/Ca²⁺.

Ce modèle est également adapté pour correspondre aux données expérimentales. Les constantes b et c sont fixées grâce aux données expérimentales : c correspond à la limite à l'infini de la fonction et donc à la contrainte résiduelle, et b peut être relié à la valeur initiale (à 0 seconde). Pour cette raison, seuls T_0 et T_m peuvent se compenser et il n'existe donc pas plusieurs jeux de valeurs donnant un résultat équivalent.

Le Tableau 6.7 rassemble les valeurs des paramètres, pour chaque matériau, permettant d'ajuster au mieux le modèle aux données expérimentales.

Tableau 6.7 : paramètres permettant d'ajuster le modèle de Taiz aux données de relaxation.

Matériau	b	c (MPa)	T ₀ (s)	T _m (s)
MFC/P35	0,169	0,230	0,2	40000
MFC/P35/Ca ²⁺	0,215	0,340	0,001	15000
MFC/XG/P35/Ca ²⁺	0,056	0,085	0,2	60000

Les paramètres b et c dépendent surtout de la rigidité du matériau, puisque la contrainte n'est ici pas normalisée.

Si on s'intéresse à la viscoélasticité, il est plus pertinent de comparer T_0 et T_m . On observe par exemple que le temps de relaxation maximal est supérieur pour le matériau contenant du xyloglucane. Cela pourrait indiquer une viscoélasticité plus prononcée.

En revanche, les paramètres T_0 et T_m sont significativement plus faibles pour le matériau MFC/P35/Ca²⁺, comparé au matériau MFC/P35. Cela semble plutôt incohérent comparé aux résultats proches obtenus pour ces deux matériaux avec plusieurs méthodes de caractérisations dans le chapitre 5.

Le modèle de Zsivanovits et Taiz donnent des conclusions similaires : la viscoélasticité des matériaux biomimétiques ne peut pas être décrite avec des temps de relaxation caractéristiques précis mais plutôt avec un spectre de temps de relaxation. Ce spectre semble s'étendre sur des temps plus longs pour le matériau contenant du xyloglucane.

Bibliographie

- Abasolo, W., Eder, M., Yamauchi, K., Obel, N., Reinecke, A., Neumetzler, L., Dunlop, J.W.C., Mouille, G., Pauly, M., Höfte, H., Burgert, I., 2009. Pectin May Hinder the Unfolding of Xyloglucan Chains during Cell Deformation: Implications of the Mechanical Performance of Arabidopsis Hypocotyls with Pectin Alterations. *Molecular Plant* 2, 990–999. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp065>
- Agoda-Tandjawa, G., Durand, S., Gaillard, C., Garnier, C., Doublier, J.-L., 2012a. Rheological behaviour and microstructure of microfibrillated cellulose suspensions/low-methoxyl pectin mixed systems. Effect of calcium ions. *Carbohydrate Polymers* 87, 1045–1057. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.021>
- Agoda-Tandjawa, G., Durand, S., Gaillard, C., Garnier, C., Doublier, J.L., 2012b. Properties of cellulose/pectins composites: Implication for structural and mechanical properties of cell wall. *Carbohydrate Polymers* 90, 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.047>
- Alba, K., Bingham, R.J., Gunning, P.A., Wilde, P.J., Kontogiorgos, V., 2018. Pectin Conformation in Solution. *J. Phys. Chem. B* 122, 7286–7294. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b04790>
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., 2011. *Plant cell walls*, Taylor and Francis. ed, Garland Science. New York, NY.
- Ali, O., Mirabet, V., Godin, C., Traas, J., 2014. Physical Models of Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 59–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122410>
- Ali, O., Traas, J., 2016. Force-Driven Polymerization and Turgor-Induced Wall Expansion. *Trends in Plant Science* 21, 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.019>
- An, J., Zhang, L., O'Neill, M.A., Albersheim, P., Darvill, A.G., 1994. Isolation and structural characterization of endo-rhamnogalacturonase-generated fragments of the backbone of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research* 264, 83–96. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00186-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00186-3)
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2004. Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methyltransferase. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3749–3753. <https://doi.org/10.1021/jf035284w>
- Arola, S., Malho, J.-M., Laaksonen, P., Lille, M., B. Linder, M., 2013. The role of hemicellulose in nanofibrillated cellulose networks. *Soft Matter* 9, 1319–1326. <https://doi.org/10.1039/C2SM26932E>
- Baskin, T.I., 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.082503.103053>
- Bauer, W.D., Talmadge, K.W., Keegstra, K., Albersheim, P., 1973. The Structure of Plant Cell Walls: II. The Hemicellulose of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells 1. *Plant Physiology* 51, 174–187. <https://doi.org/10.1104/pp.51.1.174>
- Bidhendi, A.J., Geitmann, A., 2019. Methods to quantify primary plant cell wall mechanics. *J Exp Bot* 70, 3615–3648. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz281>
- Bidhendi, A.J., Geitmann, A., 2018. Finite Element Modeling of Shape Changes in Plant Cells. *Plant Physiology* 176, 41–56. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01684>
- Bidhendi, A.J., Geitmann, A., 2016. Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J Exp Bot* 67, 449–461. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv535>
- Bingham, E.C., 1916. Plastic flow. *Journal of the Franklin Institute* 181, 845–848. [https://doi.org/10.1016/S0016-0032\(16\)90156-X](https://doi.org/10.1016/S0016-0032(16)90156-X)

- Bonfanti, A., Fouchard, J., Khalilgharibi, N., Charras, G., Kabla, A., 2020. A unified rheological model for cells and cellularised materials. *Royal Society Open Science* 7, 190920. <https://doi.org/10.1098/rsos.190920>
- Bonnin, E., Alvarado, C., Crépeau, M.-J., Bouchet, B., Garnier, C., Jamme, F., Devaux, M.-F., 2019. Mobility of pectin methylesterase in pectin/cellulose gels is enhanced by the presence of cellulose and by its catalytic capacity. *Sci Rep* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49108-x>
- Bonnin, E., Mutic, J., Nikolic, J., Burr, S., Robert, P., Crépeau, M.-J., 2015. Methylesterase behaviour is related to polysaccharide organisation in model systems mimicking cell walls. *Carbohydrate Polymers* 124, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.074>
- Bosch, M., Hepler, P.K., 2005. Pectin Methylesterases and Pectin Dynamics in Pollen Tubes. *The Plant Cell* 17, 3219–3226. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037473>
- Boudaoud, A., 2010. An introduction to the mechanics of morphogenesis for plant biologists. *Trends in Plant Science* 15, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.002>
- Boyer, J.S., 2009. Evans Review: Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. *Functional Plant Biol.* 36, 383–394. <https://doi.org/10.1071/FP09048>
- Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>
- Braybrook, S.A., Peaucelle, A., 2013. Mechano-Chemical Aspects of Organ Formation in *Arabidopsis thaliana*: The Relationship between Auxin and Pectin. *PLOS ONE* 8, e57813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057813>
- Burgert, I., Fratzl, P., 2009. Plants control the properties and actuation of their organs through the orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integrative and Comparative Biology* 49, 69–79. <https://doi.org/10.1093/icb/icp026>
- Burton, R.A., Gidley, M.J., Fincher, G.B., 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 6, 724–732. <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Caffall, K.H., Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research, Pectin: Structure and Function* 344, 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Cameron, R.G., Luzio, G.A., Goodner, K., Williams, M.A.K., 2008. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers* 71, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.007>
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P., Langendorff, V., 2005. Influence of Chain Length and Polymer Concentration on the Gelation of (Amidated) Low-Methoxyl Pectin Induced by Calcium. *Biomacromolecules* 6, 2954–2960. <https://doi.org/10.1021/bm0501858>
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Lopes da Silva, J.A., 2003. Temperature dependence of the formation and melting of pectin–Ca²⁺ networks: a rheological study. *Food Hydrocolloids, 6th International Hydrocolloids Conference - Part 2* 17, 801–807. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00101-2)
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., Penhoat, C.H. du, Goldberg, R., 1998. Investigation of the Action Patterns of Pectinmethylesterase Isoforms through Kinetic Analyses and NMR Spectroscopy: Implications in Cell Wall Expansion. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33150–33156. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33150>

- Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., Keegstra, K., 2008. Disrupting Two *Arabidopsis thaliana* Xylosyltransferase Genes Results in Plants Deficient in Xyloglucan, a Major Primary Cell Wall Component. *The Plant Cell* 20, 1519–1537. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059873>
- Chanliaud, E., Burrows, K.M., Jeronimidis, G., Gidley, M.J., 2002. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* 215, 989–996. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0783-8>
- Chanliaud, E., Silva, J.D., Strongitharm, B., Jeronimidis, G., Gidley, M.J., 2004. Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *The Plant Journal* 38, 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02018.x>
- Christgau, S., Kofod, L.V., Halkier, T., Andersen, L.N., Hockauf, M., Dörreich, K., Dalbøge, H., Kauppinen, S., 1996. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal* 319, 705–712. <https://doi.org/10.1042/bj3190705>
- Cosgrove, D.J., 2018. Diffuse Growth of Plant Cell Walls. *Plant Physiology* 176, 16–27. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01541>
- Cosgrove, D.J., 2016. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp Bot* 67, 463–476. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv511>
- Cosgrove, D.J., 2014. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology*, SI: Cell biology 22, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.11.001>
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D.J., 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 109–124. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00164-9)
- Daas, P.J.H., Meyer-Hansen, K., Schols, H.A., De Ruiter, G.A., Voragen, A.G.J., 1999. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 318, 135–145. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00093-2)
- Daas, P.J.H., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2000. Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 326, 120–129. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00037-9)
- Dammak, A., Moreau, C., Azzam, F., Jean, B., Cousin, F., Cathala, B., 2015. Influence of cellulose nanocrystals concentration and ionic strength on the elaboration of cellulose nanocrystals–xyloglucan multilayered thin films. *Journal of Colloid and Interface Science* 460, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.048>
- De Vries, J.A., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Pilnik, W., 1981. Extraction and purification of pectins from Alcohol Insoluble Solids from ripe and unripe apples. *Carbohydrate Polymers* 1, 117–127. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(81\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(81)90004-7)
- Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M., 1984. Calcium and the cell wall. *Plant, Cell & Environment* 7, 441–448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01434.x>
- Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C.M.G.C., Péan, C., Drilleau, J.-F., 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research* 327, 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00070-7)
- Derbyshire, P., McCann, M.C., Roberts, K., 2007. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-31>

- Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabolina, O.A., Hong, M., 2011. Structure and Interactions of Plant Cell-Wall Polysaccharides by Two- and Three-Dimensional Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *Biochemistry* 50, 989–1000. <https://doi.org/10.1021/bi101795q>
- Dinand, E., Chanzy, H., Vignon, M.R., 1996. Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: preparation and properties. *Cellulose* 3, 183–188. <https://doi.org/10.1007/BF02228800>
- Dronnet, V.M., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Thibault, J.-F., 1996. Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydrate Polymers* 30, 253–263. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00107-5)
- Dubrovskii, S.A., Rakova, G.V., 1997. Elastic and Osmotic Behavior and Network Imperfections of Nonionic and Weakly Ionized Acrylamide-Based Hydrogels. *Macromolecules* 30, 7478–7486. <https://doi.org/10.1021/ma970788e>
- Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D.N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., Van Loey, A., 2006. Mode of De-esterification of Alkaline and Acidic Pectin Methyl Esterases at Different pH Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7825–7831. <https://doi.org/10.1021/jf060013h>
- Falcoz-Vigne, L., 2016. Characterization and modelling of cellulose and hemicellulose interactions in microfibrillated cellulose (MFC) (PhD Thesis). Université Grenoble Alpes.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P.A., 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers* 72, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.021>
- Fathi, M., Martín, Á., McClements, D.J., 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* 39, 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>
- Favier, V., 1995. Étude de nouveaux matériaux composites obtenus à partir de latex filmogènes et de whiskers de cellulose : effets de percolation mécanique (These de doctorat). Grenoble INPG.
- Flory, P.J., Rehner, J., 1943a. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* 11, 521–526. <https://doi.org/10.1063/1.1723792>
- Flory, P.J., Rehner, J., 1943b. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. *J. Chem. Phys.* 11, 512–520. <https://doi.org/10.1063/1.1723791>
- Fobis-Loisy, I., Jaillais, Y., 2021. Feeling the pressure: A mechanical tale of the pollen tube journey through the pistil. *Developmental Cell* 56, 873–875. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.015>
- Foster, E.J., Moon, R.J., Agarwal, U.P., Bortner, M.J., Bras, J., Camarero-Espinosa, S., Chan, K.J., Clift, M.J.D., Cranston, E.D., Eichhorn, S.J., Fox, D.M., Hamad, W.Y., Heux, L., Jean, B., Korey, M., Nieh, W., Ong, K.J., Reid, M.S., Renneckar, S., Roberts, R., Shatkin, J.A., Simonsen, J., Stinson-Bagby, K., Wanasekara, N., Youngblood, J., 2018. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 47, 2609–2679. <https://doi.org/10.1039/C6CS00895J>
- Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., Van Buggenhout, S., Moldenaers, P., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2010a. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.015>
- Fraeye, I., Duvetter, T., Doungla, E., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2010b. Fine-tuning the properties of pectin–calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology* 21, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.001>
- Francillon, J., 2021. Etude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles d’hémicellulose issus d’autohydrolysats de bois (Thèse de Doctorat). Université Grenoble Alpes.

- Fry, S.C., 1989. The Structure and Functions of Xyloglucan. *J Exp Bot* 40, 1–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.1.1>
- Gaffiot, L., 2017. Optimisation d'un procédé d'élaboration d'un composite à base de fibres naturelles (These de doctorat). Université Grenoble Alpes (ComUE).
- Garnier, C., Axelos, M.A.V., Thibault, J.-F., 1993. Phase diagrams of pectin-calcium systems: Influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation. *Carbohydrate Research* 240, 219–232. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84185-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84185-9)
- GLYCOPEEDIA [WWW Document], n.d. URL <https://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-plant-cell-walls/article/plurality-of-cell-wall-types> (accessed 3.29.22).
- Goldberg, R., Pierron, M., Durand, L., Mutaftschiev, S., 1992. In Vitro and In Situ Properties of Cell Wall Pectinmethylsterases From Mung Bean Hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* 43, 41–46.
- Gou, J.-Y., Miller, L.M., Hou, G., Yu, X.-H., Chen, X.-Y., Liu, C.-J., 2012. Acetylsterase-Mediated Deacetylation of Pectin Impairs Cell Elongation, Pollen Germination, and Plant Reproduction. *The Plant Cell* 24, 50–65. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092411>
- Grasdalen, H., Einar Bakøy, O., Larsen, B., 1988. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research* 184, 183–191. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80016-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80016-8)
- Guigo, N., Mazeau, K., Putaux, J.-L., Heux, L., 2014. Surface modification of cellulose microfibrils by periodate oxidation and subsequent reductive amination with benzylamine: a topochemical study. *Cellulose* 21, 4119–4133. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0459-0>
- Guillotin, S.E., Bakx, E.J., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2005. Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. *Carbohydrate Polymers* 60, 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.001>
- Haas, K.T., Wightman, R., Meyerowitz, E.M., Peaucelle, A., 2020. Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science* 367, 1003–1007. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5103>
- Halary, J.-L., Lauprêtre, F., 2015. Mécanique des matériaux polymères. Humensis.
- Halpin, J.C., Kardos, J.L., 1976. The Halpin-Tsai equations: A review. *Polymer Engineering & Science* 16, 344–352. <https://doi.org/10.1002/pen.760160512>
- Hansen, S.L., Ray, P.M., Karlsson, A.O., Jørgensen, B., Borkhardt, B., Petersen, B.L., Ulvskov, P., 2011. Mechanical Properties of Plant Cell Walls Probed by Relaxation Spectra. *Plant Physiology* 155, 246–258. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166629>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H.V., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology* 153, 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Hill, R.J., 2008. Elastic modulus of microfibrillar cellulose gels. *Biomacromolecules* 9, 2963–2966. <https://doi.org/10.1021/bm800490x>
- Hocq, L., Habrylo, O., Voxeur, A., Pau-Roblot, C., Safran, J., Sénéchal, F., Fournet, F., Bassard, S., Battu, V., Demailly, H., Tovar, J.C., Pilard, S., Marcelo, P., Savary, B.J., Mercadante, D., Njo, M.F., Beeckman, T., Boudaoud, A., Pelloux, J., Lefebvre, V., 2021. Arabidopsis AtPME2 has a pH-dependent processivity and control cell wall mechanical properties. <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.433777>
- Hocq, L., Pelloux, J., Lefebvre, V., 2017. Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends in Plant Science* 22, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.009>

- Huynh, U.T.D., Lebrét, A., Neiers, F., Chambin, O., Assifaoui, A., 2016. Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *J. Phys. Chem. B* 120, 1021–1032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11010>
- Jarvis, M.C., 2009. Plant cell walls: supramolecular assembly, signalling and stress. *Struct Chem* 20, 245–253. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9427-y>
- Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F., Chambat, G., Cousin, F., 2009. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose–Xyloglucan Multilayers. *Langmuir* 25, 3920–3923. <https://doi.org/10.1021/la802801q>
- Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* 345, 2583–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.002>
- Jones, J.L., Marques, C.M., 1990. Rigid polymer network models. *Journal de Physique* 51, 1113–1127. <https://doi.org/10.1051/jphys:0199000510110111300>
- Kafle, K., Xi, X., Lee, C.M., Tittmann, B.R., Cosgrove, D.J., Park, Y.B., Kim, S.H., 2014. Cellulose microfibril orientation in onion (*Allium cepa* L.) epidermis studied by atomic force microscopy (AFM) and vibrational sum frequency generation (SFG) spectroscopy. *Cellulose* 21, 1075–1086. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0121-2>
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., Clamp, J.R., 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal* 151, 491–495. <https://doi.org/10.1042/bj1510491>
- Kaplan, J.L., Torode, T.A., Daher, F.B., Braybrook, S.A., 2019. On Pectin Methyl-esterification: Implications for In vitro and In vivo Viscoelasticity. <https://doi.org/10.1101/565614>
- Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, S.B., 1998. Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science* 23, 533–562. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(97\)00047-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(97)00047-6)
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P., 1973. The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components 1. *Plant Physiology* 51, 188–197. <https://doi.org/10.1104/pp.51.1.188>
- Kohn, R., 1975. Ion binding on polyuronates - alginate and pectin. *Pure and Applied Chemistry* 42, 371–397. <https://doi.org/10.1351/pac197542030371>
- Kooiman, P., 1960. A method for the determination of amyloid in plant seeds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 79, 675–678. <https://doi.org/10.1002/recl.19600790703>
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Van de Walle, D., Van Loey, A.M., Dewettinck, K., Hendrickx, M.E., 2016. Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties: Cryo-SEM visualisation and rheological properties. *Food Hydrocolloids* 61, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.018>
- Kyomugasho, C., Munyensanga, C., Celus, M., Van de walle, D., Dewettinck, K., Van Loey, A.M., Grauwet, T., Hendrickx, M.E., 2018. Molar mass influence on pectin-Ca²⁺ adsorption capacity, interaction energy and associated functionality: Gel microstructure and stiffness. *Food Hydrocolloids* 85, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.024>
- Lampugnani, E.R., Khan, G.A., Somssich, M., Persson, S., 2018. Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.207373>
- L’Enfant, M., Domon, J.-M., Rayon, C., Desnos, T., Ralet, M.-C., Bonnin, E., Pelloux, J., Pau-Roblot, C., 2015. Substrate specificity of plant and fungi pectin methylesterases: Identification of novel inhibitors of PMEs. *International Journal of Biological Macromolecules* 81, 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.066>

- Levesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S.A., Müller, K., 2015. Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta* 242, 791–811. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2358-5>
- Lewis, T.B., Nielsen, L.E., 1970. Dynamic mechanical properties of particulate-filled composites. *Journal of Applied Polymer Science* 14, 1449–1471. <https://doi.org/10.1002/app.1970.070140604>
- Li, Y., Tanaka, T., 1992. Phase Transitions of Gels. *Annual Review of Materials Research* 22, 243–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.ms.22.080192.001331>
- Lockhart, J.A., 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8, 264–275. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90077-9)
- Löfgren, C., Guillotin, S., Evenbratt, H., Schols, H., Hermansson, A.-M., 2005. Effects of Calcium, pH, and Blockiness on Kinetic Rheological Behavior and Microstructure of HM Pectin Gels. *Biomacromolecules* 6, 646–652. <https://doi.org/10.1021/bm049619+>
- Maia, T.H.S., Calazans, M., Lima, V., Moreira, F.K.V., de Almeida Lucas, A., 2019. Role of Cellulose Nanofibrils in Polymer Nanocomposites, in: *Nanocellulose*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 251–276. <https://doi.org/10.1002/9783527807437.ch8>
- Maire du Poset, A., Lerbret A., Boué, F., Zitolo, A., Assifaoui, A., Cousin, F., 2019. Tuning the structure of galacturonate hydrogels: external gelation by Ca, Zn, or Fe cationic cross-linkers. *Biomacromolecules* 7, 2864–2872. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00726>
- Manning, G.S., Ray, J., 1998. Counterion Condensation Revisited. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 16, 461–476. <https://doi.org/10.1080/07391102.1998.10508261>
- Marchessault, R.H., Sundararajan, P.R., 1983. 2 - Cellulose, in: *Aspinall, G.O. (Ed.), The Polysaccharides*. Academic Press, pp. 11–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065602-8.50007-8>
- McCann, M.C., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey, N.J., Catchpole, G., Defernez, M., Carpita, N.C., Hofte, H., Ulvskov, P., Wilson, R.H., Roberts, K., 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* 57, 811–821. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00144-3)
- McCann, M.C., Roberts, K., 1994. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* 45, 1683–1691. https://doi.org/10.1093/jxb/45.Special_Issue.1683
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell* 4, 1425–1433. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1425>
- Mirabet, V., Das, P., Boudaoud, A., Hamant, O., 2011. The Role of Mechanical Forces in Plant Morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 365–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103852>
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology, Physiology and Metabolism* - Edited by Markus Pauly and Kenneth Keegstra 11, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Muller, F., Manet, S., Jean, B., Chambat, G., Boué, F., Heux, L., Cousin, F., 2011. SANS Measurements of Semiflexible Xyloglucan Polysaccharide Chains in Water Reveal Their Self-Avoiding Statistics. *Biomacromolecules* 12, 3330–3336. <https://doi.org/10.1021/bm200881x>
- Nari, J., Noat, G., Ricard, J., 1991. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochem J* 279, 343–350. <https://doi.org/10.1042/bj2790343>
- Navon, Y., 2020. Interaction of plant cell wall building blocks: towards a bio-inspired model system (PhD Thesis). Université Grenoble Alpes.

- Nechyporchuk, O., Belgacem, M.N., Pignon, F., 2016. Current Progress in Rheology of Cellulose Nanofibril Suspensions. *Biomacromolecules* 17, 2311–2320. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00668>
- Nishiyama, Y., 2009. Structure and properties of the cellulose microfibril. *J Wood Sci* 55, 241–249. <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1029-1>
- Oakenfull, D., Scott, A., 1984. Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins. *Journal of Food Science* 49, 1093–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10401.x>
- O’neill, M., Albersheim, P., Darvill, A., 1990. 12 - The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls, in: Dey, P.M. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry, Carbohydrates*. Academic Press, pp. 415–441. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461012-5.50018-5>
- Ortega, J.K.E., 1985. Augmented Growth Equation for Cell Wall Expansion 1. *Plant Physiology* 79, 318–320. <https://doi.org/10.1104/pp.79.1.318>
- Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P.T., Ikkala, O., Lindström, T., 2007. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. *Biomacromolecules* 8, 1934–1941. <https://doi.org/10.1021/bm061215p>
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2015. Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant Cell Physiol* 56, 180–194. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu204>
- Parsegian, V.A., RAND, Fuller, Rau, 1986. Osmotic Stress for the Direct Measurement of Intermolecular Forces. *Methods in enzymology* 127, 400–416. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)27032-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)27032-9)
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., York, W.S., 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal* 20, 629–639. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00630.x>
- Peaucelle, A., Braybrook, S.A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., Höfte, H., 2011. Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in Arabidopsis. *Current Biology* 21, 1720–1726. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.057>
- Peaucelle, A., Höfte, H., Braybrook, S., 2012. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Front. Plant Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00121>
- Peaucelle, A., Wightman, R., Höfte, H., 2015. The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. *Current Biology* 25, 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.022>
- Pelletier, S., Orden, J.V., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y.A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., Lemonnier, G., Renou, J.-P., Höfte, H., 2010. A role for pectin demethylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytologist* 188, 726–739. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03409.x>
- Pelloux, J., Rustérucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* 12, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Pelmont, J., 1989. *Enzymes / Jean Pelmont, Collection Grenoble sciences. Presses universitaires de Grenoble, Grenoble.*
- Plaschina, I.G., Braudo, E.E., Tolstoguzov, V.B., 1978. Circular-dichroism studies of pectin solutions. *Carbohydrate Research* 60, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83459-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83459-X)
- Radavidson, H., 2016. Vésicules lipidiques biomimétiques décorées par un assemblage multicouche nanocristaux de cellulose/xyloglucane : élaboration et caractérisation mécanique (Thèse de Doctorat). Université Grenoble Alpes.

- Ralet, M.-C., Crépeau, M.-J., Buchholt, H.-C., Thibault, J.-F., 2003. Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochemical Engineering Journal, Biopolymers* 16, 191–201. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00037-8)
- Ralet, M.-C., Dronnet, V., Buchholt, H.C., Thibault, J.-F., 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research* 336, 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00248-8)
- Ralet, M.-C., Williams, M.A.K., Tanhatan-Nasser, A., Ropartz, D., Quémener, B., Bonnin, E., 2012. Innovative Enzymatic Approach to Resolve Homogalacturonans Based on their Methylesterification Pattern. *Biomacromolecules* 13, 1615–1624. <https://doi.org/10.1021/bm300329r>
- Renard, C.M.G.C., Jarvis, M.C., 1999. Acetylation and methylation of homogalacturonans 2: effect on ion-binding properties and conformations. *Carbohydrate Polymers* 39, 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00015-6)
- Rongpipi, S., Ye, D., Gomez, E.D., Gomez, E.W., 2019. Progress and Opportunities in the Characterization of Cellulose – An Important Regulator of Cell Wall Growth and Mechanics. *Frontiers in Plant Science* 9, 1894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01894>
- Rose, J.K.C., 2003. *The Plant Cell Wall*. CRC Press.
- Rosenbohm, C., Lundt, I., Christensen, Tove M.I.E., Young, Niall W.G., 2003. Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research* 338, 637–649. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00440-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00440-8)
- Rowland, S.P., Roberts, E.J., 1972. The nature of accessible surfaces in the microstructure of cotton cellulose. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry* 10, 2447–2461. <https://doi.org/10.1002/pol.1972.150100819>
- Ryden, P., MacDougall, A.J., Tibbits, C.W., Ring, S.G., 2000. Hydration of pectic polysaccharides. *Biopolymers* 54, 398–405. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200011\)54:6<398::AID-BIP40>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200011)54:6<398::AID-BIP40>3.0.CO;2-G)
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A.C., Findlay, K., Reiter, W.-D., McCann, M.C., 2003. Tensile Properties of Arabidopsis Cell Walls Depend on Both a Xyloglucan Cross-Linked Microfibrillar Network and Rhamnogalacturonan II-Borate Complexes. *Plant Physiology* 132, 1033–1040. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021873>
- Safran, J., Habrylo, O., Cherkaoui, M., Lecomte, S., Voxeur, A., Pilard, S., Bassard, S., Pau-Roblot, C., Mercadante, D., Pelloux, J., Sénéchal, F., 2021. New insights into the specificity and processivity of two novel pectinases from *Verticillium dahliae*. *International Journal of Biological Macromolecules* 176, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.035>
- Salas-Tovar, J.A., Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C., Escobedo-García, S., Morlett-Chávez, J.A., Rodríguez-Herrera, R., 2017. Analytical Methods for Pectin Methylesterase Activity Determination: a Review. *Food Anal. Methods* 10, 3634–3646. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0934-y>
- Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., Cameron, R.G., 2002. Characterization of a Salt-Independent Pectin Methylesterase Purified from Valencia Orange Peel. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3553–3558. <https://doi.org/10.1021/jf020060j>
- Saxe, F., Weichold, S., Reinecke, A., Lisec, J., Döring, A., Neumetzler, L., Burgert, I., Eder, M., 2016. Age Effects on Hypocotyl Mechanics. *PLOS ONE* 11, e0167808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167808>

- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schuster, E., Cucheval, A., Lundin, L., Williams, M.A.K., 2011. Using SAXS to Reveal the Degree of Bundling in the Polysaccharide Junction Zones of Microrheologically Distinct Pectin Gels. *Biomacromolecules* 12, 2583–2590. <https://doi.org/10.1021/bm200578d>
- Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., Pelloux, J., 2014. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J Exp Bot* 65, 5125–5160. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru272>
- Sila, D.N., Buggenhout, S.V., Duvetter, T., Fraeye, I., Roeck, A.D., Loey, A.V., Hendrickx, M., 2009. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure–Function Relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 86–104. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x>
- Sinitsya, A., Copiková, J., Pavliková, H., 1998. ¹³C CP/MAS NMR Spectroscopy in the Analysis of Pectins. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 17, 279–292. <https://doi.org/10.1080/07328309808002328>
- Siqueira, G., Bras, J., Dufresne, A., 2010. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. *Polymers* 2, 728–765. <https://doi.org/10.3390/polym2040728>
- Slavov, A., Garnier, C., Crépeau, M.-J., Durand, S., Thibault, J.-F., Bonnin, E., 2009. Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers* 77, 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.014>
- Somerville, C., 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 53–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.022206.160206>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., 2004. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* 306, 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Sriamornsak, P., Kennedy, R.A., 2008. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics* 358, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.009>
- Sriamornsak, P., Kennedy, R.A., 2006. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. *International Journal of Pharmaceutics* 323, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.045>
- Stelte, W., Sanadi, A.R., 2009. Preparation and Characterization of Cellulose Nanofibers from Two Commercial Hardwood and Softwood Pulps. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 11211–11219. <https://doi.org/10.1021/ie9011672>
- Ström, A., Ribelles, P., Lundin, L., Norton, I., Morris, E.R., Williams, M.A.K., 2007. Influence of Pectin Fine Structure on the Mechanical Properties of Calcium–Pectin and Acid–Pectin Gels. *Biomacromolecules* 8, 2668–2674. <https://doi.org/10.1021/bm070192r>
- Taiz, L., 1984. Plant Cell Expansion: Regulation of Cell Wall Mechanical Properties. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35, 585–657. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.003101>
- Tanhatan-Nasseri, A., Crépeau, M.-J., Thibault, J.-F., Ralet, M.-C., 2011. Isolation and characterization of model homogalacturonans of tailored methylesterification patterns. *Carbohydrate Polymers* 86, 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.019>
- Thibault, J.-F., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Roger, P., Crépeau, M.-J., 1993. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research* 238, 271–286. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87019-O](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87019-O)

- Thompson, J.E., Fry, S.C., 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, 275–286. <https://doi.org/10.1007/s004250000287>
- Turbak, A.F., Snyder, F.W., Sandberg, K.R., 1983. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.*; (United States) 37.
- Vanstreels, E., Alamar, M.C., Verlinden, B.E., Enninghorst, A., Loodts, J.K.A., Tijssens, E., Ramon, H., Nicolai, B.M., 2005. Micromechanical behaviour of onion epidermal tissue. *Postharvest Biology and Technology* 37, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.004>
- Ventura, I., Jammal, J., Bianco-Peled, H., 2013. Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin–calcium gels. *Carbohydrate Polymers* 97, 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.055>
- Vervoort, S., 2006. Behaviour of hydrogels swollen in polymer solutions under mechanical action (PhD Thesis). École Nationale Supérieure des Mines de Paris.
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W.S., O'Neill, M.A., Glushka, J., Darvill, A.G., Albersheim, P., 2000. Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research* 326, 277–294. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00036-7)
- Videcoq, P., Garnier, C., Robert, P., Bonnin, E., 2011. Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins. *Carbohydrate Polymers* 86, 1657–1664. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.081>
- Videcoq, P., Steenkeste, K., Bonnin, E., Garnier, C., 2013. A multi-scale study of enzyme diffusion in macromolecular solutions and physical gels of pectin polysaccharides. *Soft Matter* 9, 5110–5118. <https://doi.org/10.1039/C3SM00058C>
- Villares, A., Bizot, H., Moreau, C., Rolland-Sabaté, A., Cathala, B., 2017. Effect of xyloglucan molar mass on its assembly onto the cellulose surface and its enzymatic susceptibility. *Carbohydrate Polymers* 157, 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.072>
- Vincken, J.P., de Keizer, A., Beldman, G., Voragen, A.G.J., 1995. Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiology* 108, 1579–1585. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1579>
- Vincken, J.-P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F., 2003. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology* 132, 1781–1789. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022350>
- Vogler, H., Draeger, C., Weber, A., Felekis, D., Eichenberger, C., Routier-Kierzkowska, A.-L., Boisson-Dernier, A., Ringli, C., Nelson, B.J., Smith, R.S., Grossniklaus, U., 2013. The pollen tube: a soft shell with a hard core. *The Plant Journal* 73, 617–627. <https://doi.org/10.1111/tpj.12061>
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.-J., Verhoef, R.P., Schols, H.A., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem* 20, 263. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wang, T., Hong, M., 2016. Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *Journal of Experimental Botany* 67, 503–514. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv416>
- Wang, T., Park, Y.B., Cosgrove, D.J., Hong, M., 2015. Cellulose-Pectin Spatial Contacts Are Inherent to Never-Dried Arabidopsis Primary Cell Walls: Evidence from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiology* 168, 871–884. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00665>
- Wei, C., Lintilhac, L.S., Lintilhac, P.M., 2006. Loss of stability, pH, and the anisotropic extensibility of Chara cell walls. *Planta* 223, 1058–1067. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0152-5>

- Willats, W.G.T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., Alebeek, G.-J.W.M. van, Voragen, A.G.J., Marcus, S.E., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S., Knox, J.P., 2001. Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls: Implications For Pectin Methyl Esterase Action, Matrix Properties, And Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 19404–19413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011242200>
- Wolf, S., Greiner, S., 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249, 169–175. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0371-5>
- Wolnik, A., 2014. Association des copolymères à séquences (1->4)-a-L-gulonane en présence d'ions calcium (PhD Thesis). Université de Grenoble.
- Yamamoto, R., Shinozaki, K., Masuda, Y., 1970. Stress-relaxation properties of plant cell walls with special reference to auxin action. *Plant and Cell Physiology* 11, 947–956. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074586>
- Yapo, B.M., Koffi, K.L., 2013. Utilisation of model pectins reveals the effect of demethylated block size frequency on calcium gel formation. *Carbohydrate Polymers* 92, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.010>
- Yilmaz, N., Kodama, Y., Numata, K., 2020. Revealing the Architecture of the Cell Wall in Living Plant Cells by Bioimaging and Enzymatic Degradation. *Biomacromolecules* 21, 95–103. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00979>
- Zamil, M.S., Yi, H., Puri, V.M., 2015. The mechanical properties of plant cell walls soft material at the subcellular scale: the implications of water and of the intercellular boundaries. *J Mater Sci* 50, 6608–6623. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9204-9>
- Zerzour, R., Kroeger, J., Geitmann, A., 2009. Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. *Developmental Biology* 334, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.044>
- Zhan, D., Janssen, P., J. Mort, A., 1998. Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. *Carbohydrate Research* 308, 373–380. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00096-2)
- Zhang, T., Mahgsoody-Louyeh, S., Tittmann, B., Cosgrove, D.J., 2014. Visualization of the nanoscale pattern of recently-deposited cellulose microfibrils and matrix materials in never-dried primary walls of the onion epidermis. *Cellulose* 21, 853–862. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9996-1>
- Zhang, T., Tang, H., Vavylonis, D., Cosgrove, D.J., 2019. Disentangling loosening from softening: insights into primary cell wall structure. *The Plant Journal* 100, 1101–1117. <https://doi.org/10.1111/tpj.14519>
- Zhao, Z., Crespi, V.H., Kubicki, J.D., Cosgrove, D.J., Zhong, L., 2014. Molecular dynamics simulation study of xyloglucan adsorption on cellulose surfaces: effects of surface hydrophobicity and side-chain variation. *Cellulose* 21, 1025–1039. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0041-1>
- Zhu, X., Liu, B., Zheng, S., Gao, Y., 2014. Quantitative and structure analysis of pectin in tobacco by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. *Anal. Methods* 6, 6407–6413. <https://doi.org/10.1039/C4AY01156B>
- Zsivanovits, G., MacDougall, A.J., Smith, A.C., Ring, S.G., 2004. Material properties of concentrated pectin networks. *Carbohydrate Research* 339, 1317–1322. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.027>
- Zsivánovits, G., Marudova, M., Ring, S., 2005. Influence of mechanical properties of pectin films on charge density and charge density distribution in pectin macromolecule. *Colloid Polym Sci* 284, 301. <https://doi.org/10.1007/s00396-005-1378-2>

- Zykwinska, A., Thibault, J.-F., Ralet, M.-C., 2008. Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers* 74, 957–961. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.004>
- Zykwinska, A.W., Ralet, M.-C.J., Garnier, C.D., Thibault, J.-F.J., 2005. Evidence for In Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiology* 139, 397–407. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>

Résumé

L'objectif de cette thèse est de concevoir et étudier des matériaux biomimétiques de la paroi primaire végétale. La paroi primaire est principalement composée de microfibrilles de cellulose, de pectines et de xyloglucane. Des familles d'enzymes modifiant la structure des pectines ont un rôle dans la modulation des propriétés mécaniques de la paroi et dans la régulation de sa croissance. Mais les mécanismes impliqués sont difficiles à analyser in planta et des matériaux mimétiques incorporant les principaux composants de la paroi cellulaire végétale pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

Une première partie du projet s'intéresse au comportement de ces matériaux obtenus par casting et réhydratés dans le but de comprendre les interactions entre les polysaccharides et l'architecture des matériaux. Ces derniers sont analogues à des gels dont on peut analyser le gonflement et les propriétés mécaniques. L'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, pression osmotique) et de la composition en polysaccharide sur ces propriétés est évaluée. Ensuite, des enzymes de remodelages des pectines (PME, PG) ont été appliquées sur les matériaux pour évaluer l'impact de ce substrat sur leur comportement et les conséquences sur les propriétés des matériaux. Enfin, une étude plus approfondie des propriétés mécaniques a été réalisée pour interpréter plus précisément les relations entre la structure complexe de ce composite et ses propriétés visco-élasto-plastique. Les résultats obtenus dans le cadre de l'ANR Wallmime sont comparés aux observations faites in planta à l'Université de Picardie (groupe de J. Pelloux) et par mesure AFM (groupe de A. Boudaoud).

Des matériaux composites biosourcés et biodégradables dont les propriétés peuvent être modulées par voie enzymatique ont ainsi été développés.

Abstract

The objective of this thesis is to design and study biomimetic materials of the plant primary wall. The primary wall is mainly composed of cellulose microfibrils, pectins and xyloglucan. Families of enzymes modifying the pectin structure have a role in modulating the mechanical properties of the wall and in regulating its growth. However, the mechanisms involved are difficult to analyze in planta and mimetic materials incorporating the main components of the plant cell wall could provide a better understanding of the mechanisms involved.

The first part of the project focuses on the behavior of these materials obtained by casting and rehydrated in order to understand the interactions between polysaccharides and the architecture of the materials. These materials are analogous to gels whose swelling and mechanical properties can be analyzed. The influence of several physicochemical parameters (pH, ionic strength, osmotic pressure) and of the polysaccharide composition on these properties is evaluated. Then, pectin remodeling enzymes (PME, PG) were applied on the materials to evaluate the impact of this substrate on their behavior and the consequences on the material properties. Finally, a more in-depth study of the mechanical properties was carried out to interpret more precisely the relationships between the complex structure of this composite and its visco-elasto-plastic properties. The results obtained within the framework of the ANR Wallmime are compared to the observations made in planta at the University of Picardie (J. Pelloux's group) and by AFM measurement (A. Boudaoud's group).

Biosourced and biodegradable composite materials whose properties can be modulated by enzymatic way were thus developed.